

09/155514

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP98/00370

29.01.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年 1月29日

REC'D 08 APR 1998

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

平成 9年特許願第015118号

出願人
Applicant(s):

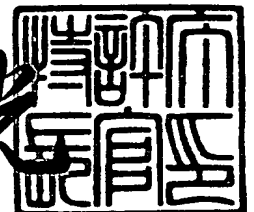
東レ株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 3月20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3019501

【書類名】 特許願

【整理番号】 66A20410-A

【提出日】 平成 9年 1月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 16/46
C12N 15/12

【発明の名称】 インテグリンと免疫グロブリンのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体

【請求項の数】 42

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社基礎研究所内

【氏名】 戒能 美枝

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社基礎研究所内

【氏名】 田中 利明

【特許出願人】

【識別番号】 000003159

【郵便番号】 103

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号

【氏名又は名称】 東レ株式会社

【代表者】 前田 勝之助

【電話番号】 03-3245-5648

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 005186

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インテグリンと免疫グロブリンのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質。

【請求項2】 インテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質。

【請求項3】 インテグリンの α 鎖が $\alpha 4$ である請求項1記載のキメラ蛋白質。

【請求項4】 配列表の配列番号1のアミノ酸配列で示される請求項3記載のキメラ蛋白質。

【請求項5】 インテグリンの α 鎖が $\alpha 2$ である請求項1記載のキメラ蛋白質。

【請求項6】 配列表の配列番号19のアミノ酸配列で示される請求項5記載のキメラ蛋白質。

【請求項7】 インテグリンの β 鎖が $\beta 1$ である請求項2記載のキメラ蛋白質。

【請求項8】 配列表の配列番号2のアミノ酸配列で示される請求項7記載のキメラ蛋白質。

【請求項9】 請求項1記載のキメラ蛋白質と請求項2記載のキメラ蛋白質が会合してなるキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

【請求項10】 以下の組み合わせから選ばれる請求項9記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

(1) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖からなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖からなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン重鎖- β 鎖・免疫グロブリン重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

(2) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖からなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの軽鎖からなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン重鎖- β 鎖・免疫グロブリン軽鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

(3) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリン軽鎖からなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖からなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン軽鎖- β 鎖・免疫グロブリン重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

【請求項11】 インテグリンの α 鎖が $\alpha 4$ である請求項9または10記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

【請求項12】 インテグリンの α 鎖が $\alpha 2$ である請求項9または10記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

【請求項13】 インテグリンの β 鎖が $\beta 1$ である請求項9または10記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

【請求項14】 インテグリンの α 鎖が $\alpha 4$ であり β 鎖が $\beta 1$ である請求項9または10記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

【請求項15】 インテグリンの α 鎖が $\alpha 2$ であり β 鎖が $\beta 1$ である請求項9または10記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

【請求項16】 請求項1記載のキメラ蛋白質を暗号化するDNA。

【請求項17】 請求項2記載のキメラ蛋白質を暗号化するDNA。

【請求項18】 請求項3記載のキメラ蛋白質を暗号化するDNA。

【請求項19】 配列番号1の塩基配列で示される請求項18記載のDNA。

【請求項20】 請求項5記載のキメラ蛋白質を暗号化するDNA。

【請求項21】 配列番号19の塩基配列で示される請求項20記載のDNA。

【請求項22】 請求項7記載のキメラ蛋白質を暗号化するDNA。

【請求項23】 配列番号2の塩基配列で示される請求項22記載のDNA。

【請求項24】 請求項16記載のDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

【請求項25】 請求項17記載のDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

【請求項26】 請求項18記載のDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

【請求項27】請求項20記載のDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

【請求項28】請求項22記載のDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

【請求項29】請求項24および請求項25記載の組み換えベクターにより同時に形質転換された動物細胞。

【請求項30】請求項26および請求項28記載の組み換えベクターにより同時に形質転換された請求項29記載の動物細胞。

【請求項31】請求項27および請求項28記載の組み換えベクターにより同時に形質転換された請求項29記載の動物細胞。

【請求項32】請求項29記載の動物細胞を培養することを特徴とする請求項9記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の製造方法。

【請求項33】請求項9～15記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体からなる医薬。

【請求項34】（1）インテグリンと免疫グロブリンのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドを接触させて混合物を作製し、（2）前記混合物を、リガンドに結合したキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量もしくはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に結合したリガンド量を測定する、ことを特徴とする請求項9～15記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドの結合を試験する方法。

【請求項35】（1）インテグリンと免疫グロブリンのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と細胞を接触させて混合物を作製し、（2）前記混合物を、細胞に結合したキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量もしくはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に結合した細胞量について測定する、ことを特徴とする請求項9～15記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と細胞の結合を試験する方法。

【請求項36】請求項34または請求項35記載の方法を用いてインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質を探索する方法。

【請求項37】リガンドが配列番号4で示されるフィブロネクチンフラグメントである請求項34または請求項35記載の方法。

【請求項38】リガンドがコラーゲンである請求項34または請求項35記載の方法。

【請求項39】請求項36記載の方法を用いて得られる、結合阻害性の蛋白質、ペプチド、または低分子化合物。

【請求項40】請求項9～15記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いてインテグリンに結合する物質を探索する方法。

【請求項41】請求項40記載の方法を用いて得られるインテグリンに結合する物質。

【請求項42】請求項9～15記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を構成成分とすることを特徴とするインテグリンのリガンドの量を測定する試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、インテグリンの α 鎖または β 鎖の細胞外部分と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖が連結したキメラ蛋白質を動物細胞を用いて同時に発現させ產生されるインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体、その製造方法、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドおよび細胞との結合を試験する方法、その方法を用いて得られるインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いるインテグリンに結合する物質の探索方法および結合する物質、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の医薬および試薬としての用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

種々の細胞は細胞と細胞の間の接着を媒介する受容体や細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介する受容体を有し、それら受容体が免疫・炎症反応、発生、形態形成、創傷治癒、止血、癌転移などに重要な役割を果たしている。これらの現象に関与する受容体を分離、同定した結果、いわゆる細胞接着分子の存在が明らかにされた。次々と同定される分子の多くは、その構造的特徴から、インテグリン

ンスーパーファミリー、イムノグロブリンスーパーファミリー、セレクトインファミリー、カドヘリンファミリーなどに分類されている (Corlos, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994)、Albelda, S. M. and Buck, C. A. FASEB J. 2868-2880 (1990))。

【0003】

インテグリンスーパーファミリーに属する受容体は、互いに異なる膜蛋白質である α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットが非共有結合により会合したヘテロダイマー複合体構造を持つ (Hynes, R. O. Cell 48, 549-554 (1987))。当初、インテグリンスーパーファミリーに属する分子は、共有する β 鎖の種類により β 1インテグリン、 β 2インテグリン、 β 3インテグリンの3つのサブファミリーに分類されていたが、その後新しい β 鎖、 α 鎖が次々と見つかり、現在では8種類の β 鎖、15種類の α 鎖が同定されている (Corlos, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994)、Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis. Sci. 37, 696-701 (1996))。それぞれの β 鎖は1種から8種の α 鎖と会合することが知られており、その結果21種類の α 鎖と β 鎖のペアすなわちインテグリン分子が今までに同定されている (Corlos, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994)、Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis. Sci. 37, 696-701 (1996))。この中には、医薬品開発のターゲットとなっている α 4 β 1 (インテグリン、 β 1インテグリン)、 α L β 2 (LFA-1、 β 2インテグリン)、 α M β 2 (Mac-1、 β 2インテグリン)、 α IIb β 3 (GP IIb/IIIa、 β 3インテグリン) などが含まれている (Drug and Market Development 6, 201-205 (1995))。他のインテグリンにも疾患との関連が予想されるものが多い。

【0004】

インテグリンの持つヘテロダイマー複合体構造は、リガンドとの結合において重要な役割を果たしている (Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. Science 238, 491-497 (1987)、Hynes, R. O. Cell 48, 549-554 (1987))。例えば、インテグリン上のリガンド結合部位は α 鎖と β 鎖の両方から構成されると推定されている (Hynes, R. O. Cell 69, 11-25 (1992))。同じ α 鎖を持ち異なる β 鎖

と会合しているインテグリン、あるいは同じ β 鎖を持ち異なる α 鎖と会合しているインテグリンの基質特異性がそれぞれ異なる (Hynes, R. O. Cell 69, 11-25 (1992)、Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophtal. Vis.Sci. 37, 696-701 (1996)) という事実は、この推測を支持している。一方、一部のインテグリンの α 鎖はその分子中に約180アミノ酸からなるIドメインと呼ばれる配列を挿入していることが報告されているが、このIドメインだけでリガンドに結合しうること示唆するデータが報告された (Kamata, T. and Takada, Y. J. Biol. Chem. 269, 26006-26010 (1994)、Ueda, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 91, 10680-10684 (1994))。しかしながら、 α 鎖のIドメインと元のヘテロダイマー複合体であるインテグリンとはリガンドへの結合の様式が異なっていることも同時に示されている (Kamata, T. and Takada, Y. J. Biol. Chem. 269, 26006-26010 (1994))。またリガンドに対する特異性、親和性などのパラメーターが同一かどうかは明らかにされていない。Iドメインを含まないインテグリン、例えば $\alpha 4 \beta 1$ の場合、部分構造だけでリガンドに結合するという報告はない。

【0005】

インテグリンをそのヘテロダイマー複合体構造を維持し、従ってリガンド結合能を保持したまま単離・調製することができれば、自然に近い状態でのリガンドへの結合様式を検討するために有用である。さらに、そのまま医薬品として用いることができるだけでなく、組織や血清中のリガンド量を測定するための試薬として利用したり、接着阻害化合物を探索する際の材料とするなどきわめて有用である。しかしながら、インテグリンをその機能を保持したまま単離・調製することは非常に難しいとされている。その理由として、前述のようにインテグリンの α 鎖と β 鎖の会合が非共有結合のみで維持されているため、単離・調製途中でこの結合が容易に解離してしまうことが上げられる。インテグリンが膜蛋白質であるため可溶化の際に界面活性剤などを用いる必要のあることが複合体解離の大きな要因と考えられる。言い換えると、非共有結合によって機能構造が維持されている点はその調製を阻んでいる要因である。

【0006】

上述のように困難ではあるものの、これまでにインテグリンヘテロダイマー複合体を機能を保ったまま単離・精製した例がいくつか報告されている。 $\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ の例では、親和性カラムクロマトグラフィーを用いて精製したインテグリンをリボソームに取り込ませることにより、リガンドへの結合が測定できることが示されている (Santoro, S. A. et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 153, 217-223 (1988)、Pytela, R. et al. *Cell* 40, 191-198 (1985)、Pytela, R. et al. *Method. Enzymol* 144, 475-489 (1987))。別の例では、精製した $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ をプレートに固相化することによりそれらのインテグリンを介する細胞接着を阻害するペプチドを選択できることが示されている (Koivunen, E. et al. *J. Biol. Chem.* 268, 20205-20210 (1993)、Healy, J. M. et al. *Biochemistry* 34, 3948-3955 (1995))。さらに別の例では、精製した $\alpha v \beta 3$ または $\alpha 4 \beta 1$ をプレートに固相化することによりリガンドとの結合が測定できることが示されている (Charo, I. F. et al. *J. Cell Biol.* 111, 2795-2800 (1990)、Makarem, R. et al. *J. Biol. Chem.* 269, 4005-4011 (1994)、Paul Mould, A. et al. *J. Biol. Chem.* 269, 27224-27230 (1994))。別の例では、遺伝子操作の手法を用いて調製した細胞外部分だけからなる $\alpha I I b \beta I I I$ ヘテロダイマー複合体を、複合体特異的な抗体を介してプレートに固相化させることによりリガンドとの結合を測定できることが示されている (Gulino, D. et al. *Eur. J. Biochem.* 227, 108-115 (1995))。これらの例は、精製したインテグリンの機能を発揮させる際に、そのヘテロダイマー複合体を何らかの担体に結合または内包させる必要があることを示している。担体が必要な理由として、ヘテロダイマー複合体が非共有結合で会合しているため溶液中で解離し、その結果機能的な構造を維持できないことが考えられる。最後の例では、複合体特異的な抗体を用いてヘテロダイマー複合体構造を持つ分子のみを選択し、両鎖が解離しない状態で結合を測定する工夫がなされている。

【0007】

担体を必要としない例として、精製された $\alpha 1 \beta 1$ または $\alpha 2 \beta 1$ が担体を利用しなくてもリガンドとの結合を測定できる例が報告されている (Pfaff, M. et

al. Eur. J. Biochem. 225, 975-984 (1994))。この場合には精製過程に含まれる界面活性剤がリポソームと類似の役割を果たし担体として働いていると考えられる。さらに別の例として、遺伝子操作の手法を用いて調製した細胞外部分だけからなる $\alpha M\beta 2$ ヘテロダイマー複合体がリガンドに結合することが示されている (Dana, N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3106-3110 (1991)、Berman, P. W. et al. J. Cell Biochem. 52, 183-195 (1993))。これらの例では、前記のような担体の必要性は示されていないが、ヘテロダイマー複合体分子間の会合は非共有結合のみで維持されている点は改善されていない。

【0008】

また他の例として αd と免疫グロブリンのキメラ蛋白質が開示されているが (特表平8-507933)、免疫沈降の結果しか示されておらず、リガンドへの結合は調べられていない。また、 β 鎖を同時に免疫グロブリンとのキメラ蛋白質として発現したわけではないので、 α 鎖と β 鎖の間の結合は非共有結合のままである。

【0009】

以上の事実は、未だかつて、インテグリンの α 鎖 β 鎖を構造的に安定に会合させ機能を維持したまま調製した例がないことを示している。複合体構造が不安定であることは、その分子の利用を制限するものである。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

前記のように、インテグリンの α 鎖と β 鎖を構造的に安定に会合させ機能を維持したまま調製した例は知られていない。本発明では、インテグリンの α 鎖または β 鎖と免疫グロブリンの軽鎖または重鎖との間でキメラ分子を作製することにより、 α 鎖と β 鎖の会合を構造的に安定化したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を作製した。すなわち、本発明は、インテグリンの α 鎖または β 鎖の細胞外部分と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖が連結したキメラタンパク質を動物細胞を用いて同時に発現させ産生されるインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体、その製造方法、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドおよび細胞と

の結合を試験する方法、その方法を用いて得られるインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いるインテグリンに結合する物質の探索方法および結合する物質、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の医薬および試薬としての用途に関する。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意努力を重ねた結果、接着分子インテグリンの α 鎖と β 鎖をそれぞれ免疫グロブリンの軽鎖または重鎖と連結したキメラ分子を遺伝子操作の方法を利用して同時に動物細胞で発現させることにより、 α 鎖と β 鎖とが安定に会合したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を製造し上記の課題を解決することに成功した。得られたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体はそのまま医薬として利用可能であるばかりでなく、インテグリンとリガンドとの結合の測定、阻害化合物の探索、に利用できる。さらには診断薬にも利用できる。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明で述べるインテグリンとは、 α 鎖と β 鎖の2種の膜蛋白質のヘテロダイマー複合体からなるインテグリンスーパーファミリーに属する分子 (Corlós, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994)、 Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis.Sci. 37, 696-701 (1996)) を指す。本発明にはこのファミリーに属する分子の変異体も含まれるものとする。本発明の α 鎖としては、すでに同定されている前述の15種類が含まれ、 β 鎖としてはすでに同定されている前述の8種類が含まれるが、特にこれに限定されるものではない。また、 α 鎖と β 鎖のペアからなるインテグリン分子としては、すでに同定されている前述の21種類が含まれるが、特にこれに限定されるものではない。

【0013】

本発明においては、インテグリンスーパーファミリーの中でも β 鎖が $\beta 1$ である $\beta 1$ インテグリンファミリーの分子または α 鎖として $\alpha 4$ あるいは $\alpha 2$ を持つ

インテグリン分子が好ましい。さらに、 α 鎖が $\alpha 4$ あるいは $\alpha 2$ であり、 β 鎖が $\beta 1$ であるインテグリンが好ましい。

【0014】

インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とは、インテグリンの α 鎖の細胞外領域が免疫グロブリンを構成する重鎖あるいは軽鎖の定常領域と結合した分子を指す。この場合、蛋白質のN末端側にインテグリン分子、その後に免疫グロブリン分子が並ぶようなキメラ蛋白質が好ましい。インテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とは、インテグリンの β 鎖の細胞外領域が免疫グロブリンを構成する重鎖あるいは軽鎖の定常領域と結合した分子を指す。この場合も蛋白質のN末端側にインテグリン分子、その後に免疫グロブリンが並ぶようなキメラ蛋白質が好ましい。 α 鎖と β 鎖のいずれの場合にも免疫グロブリンの重鎖と結合したキメラ蛋白質が好ましい。

【0015】

また α 鎖あるいは β 鎖と結合させる免疫グロブリンのアイソタイプは特に限定されるものではない。IgG、IgM、IgA、IgEのいずれも利用しうが、IgGを用いることが好ましい。IgGのサブクラスとしては、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄があるが、IgG₁を用いるのが好ましい。さらに免疫グロブリンの代わりに分子間にジスルフィド結合を有するダイマー構造の分子を利用することも可能である。

【0016】

本発明では、インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質が会合してなる分子をインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と呼ぶ。このとき α 鎖・免疫グロブリン重鎖（ α 鎖と免疫グロブリン重鎖のキメラ蛋白質の意、他も同様）と β 鎖・免疫グロブリン重鎖、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン軽鎖、 α 鎖・免疫グロブリン軽鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖の組み合わせが考えられる。これらのどの組み合わせでもよいが、好ましくは α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン

ン重鎖の組み合わせがよい。

【0017】

以下にインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の調製方法を述べるが、これに限定されるものではない。

【0018】

インテグリンの α 鎖および β 鎖を暗号化するDNAを得るには、公知のcDNA配列の情報を利用して、PCR法による遺伝子増幅、cDNAクローニング、DNA合成などの方法を利用しうる。例えば $\alpha 4$ および $\beta 1$ のDNA配列はすでに文献に報告されている (Takada, Y. et al. EMBO J. 8, 1361-1368 (1989)、Scott Argraves, W. et al. J. Cell Biol. 105, 1183-1190 (1987))。インテグリンの α 鎖と β 鎖を暗号化するDNAを得る別の方法として、抗体を利用する発現クローニングなども利用しうる。免疫グロブリンの定常領域を暗号化するDNAと結合するために、インテグリンの α 鎖と β 鎖の細胞外部分のみを暗号化するDNAを取り出すことが望ましい。そのためには、PCR法およびDNA合成法を用いることが好ましい。ここでいう細胞外部分とは、 α 鎖と β 鎖いずれの場合にも膜貫通部分と予想されている部分よりN末端側のポリペプチド配列を指す。リガンドとの結合能が維持されればその部分配列を用いることも可能であるが、細胞外領域と考えられている部分の大部分を用いることが好ましい。DNAを取り出す際には、免疫グロブリンを暗号化するDNAと連結した後にフレームがあうように調整を加えておく必要がある。例えば、PCR法によりDNA断片を取り出す場合にはプライマーに変異を加えることによりこれを達成しうる。この場合、プライマーの塩基置換によりアミノ酸変異がおきないように設計することが望ましい。ただしキメラ蛋白質の機能に変化を与えない範囲でのアミノ酸置換は許容しうる。化学合成によりDNAを得る場合には、免疫グロブリンを暗号化するDNAと連結し得るように配列を設計しておくことで目的を達する。cDNAの場合には、DNAの切断と合成DNAを利用して、免疫グロブリンを暗号化するDNAと結合できるDNAを調製しうる。

【0019】

次に免疫グロブリンを暗号化するDNAを調製する。本発明においてはヒト免

疫グロブリン重鎖および軽鎖を暗号化するDNAを用いることが望ましいが、他の動物種の免疫グロブリンを暗号化するDNAも利用しうる。ヒトIgGを暗号化するDNAの調製例はすでに報告されているが (Ellison, J. W. et al. *Nucleic Acids Res.* 10, 4071-4079 (1982)、Martin, T. et al. *Eur. J. Immunol.* 22, 1773-1779 (1992))、これに限定されるものではない。前述のインテグリン α 鎖、 β 鎖を暗号化するDNAの調製と同様の方法を利用してもよい。本発明においてはヒト免疫グロブリン重鎖として、ゲノムDNAを用いることが好ましいが、cDNAを用いてもよい。ヒト免疫グロブリン重鎖のDNAとしては、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域を暗号化する部分を用いることが好ましいが、CH1~CH3の定常領域全体を暗号化するDNAを利用してもよい。免疫グロブリン軽鎖の場合にはCL領域を暗号化するDNAを用いる。最終的に α 鎖あるいは β 鎖の細胞外部分を暗号化するDNAとヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域を暗号化するDNAをフレームをあわせて連結する。得られたDNAは翻訳開始のメチオニンに始まって、インテグリンの α 鎖または β 鎖のシグナル配列、その細胞外領域、ヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域をこの順に連結したポリペプチドを暗号化する。

【0020】

上記で得られたインテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を暗号化するDNA、あるいはインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を暗号化するDNA、をそれぞれ適当な発現制御配列に機能的に連結し、組み換えベクターを得る。組み換えベクターの作製方法、細胞への導入方法、など一般的な遺伝子組み換えに関する方法は成書に記載されているが ("Molecular Cloning" Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)、これに限定されるものではない。本発明においては、動物細胞での蛋白質発現に適した発現制御配列を用いることが望ましい。例えば、SR α プロモーター、サイトメガロウイルス由来プロモーター、シミアンウイルス40由来プロモーターなどが発現制御配列として一般的に用いられているが、これらに限定されるものではない。本発明においてはSR α プロモーターを用いることが好ましい。

【0021】

得られた組み換えベクターを細胞に導入することにより、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体産生細胞を得る。このとき、動物由来細胞を宿主として用いることが好ましい。たとえば、COS細胞（サル腎臓細胞）、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）などが宿主として一般的に利用されている。また、P3U1やY3などのミエローマ細胞を用いてもよい。その他の株化細胞やクローン化細胞も利用しうるが、これらに限定されるものではない。本発明においては、CHO細胞を用いることが好ましい。

【0022】

細胞に組み換えベクターを導入する方法としては、リポフェクチン法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などが知られており、いずれの方法を用いてもよい。ただしこれらに限定されるものではない。組み換えベクターを用いて細胞を形質転換する際に、インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を発現する組み換えベクター、およびインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を発現する組み換えベクター、を薬剤耐性マーカーを変えて順次細胞に導入することが好ましい。導入はどのような順序で行ってもかまわない。また、同時に導入してもよい。導入する2種の組み換えベクターとしては、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖（ α 鎖と免疫グロブリン重鎖のキメラ蛋白質の意、他も同様）と β 鎖・免疫グロブリン重鎖、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン軽鎖、 α 鎖・免疫グロブリン軽鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖の組み合わせを発現するベクターがよい。これらのどの組み合わせでもよいが、好ましくは α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖を発現する組み換えベクターの組み合わせがよい。

【0023】

いずれの形質転換方法、ベクターの組み合わせによっても、同時に2種の組み換えベクターで形質転換され、しかも α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質を同時にほぼ同量、産生している細胞を選別することが重要である。これは、組み換えベクターで形質転換された細胞の培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽

鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の産生量を測定することで達成できる。測定方法としては、例えば公知の方法に従って形質転換細胞を ^{35}S を含む培地で培養することにより蛋白質をラベル化した後、培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の存在量をそれぞれの抗 α 鎖抗体または抗 β 鎖抗体を用いる免疫沈降することにより推定することができる。他の方法としては、抗ヒト免疫グロブリン抗体と抗 α 鎖抗体または抗 β 鎖抗体を用いるELISA法によって培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の存在量を推定することができる。いずれにしても培養上清中への α 鎖および β 鎖のキメラ蛋白質の産生量がほぼ同量で、多量に産生しているクローンを選別することがインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の調製のためには好ましい。蛋白質のラベル化方法、免疫沈降の方法、ELISAの一般的方法は成書に記載されているが("Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)、これに限定されるものではない。またキメラ蛋白質の検出のために他の方法も利用しうる。

【0024】

得られた形質転換細胞を一般的な細胞培養の方法に従って培養し、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生させることができる。培地として、低免疫グロブリン濃度の血清を5%程度含む培地が好ましいが、一般に知られている血清含有培地や無血清培地でもよい。細胞を培養後、遠心分離などの操作により細胞および固形物を除去し、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む培養上清を回収する。

【0025】

この培養上清中には α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質と β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質がヘテロダイマー複合体を形成したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質だけでなく、ヘテロダイマー複合体を形成していない α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質が混入していると推定

できる。しかし、ヘテロダイマー複合体以外の分子はリガンドへの結合能を持たないことから、この培養上清をリガンドまたは細胞との結合の試験、インテグリンとリガンドの結合を阻害する物質の探索、インテグリンに結合する物質の探索、インテグリンのリガンド量を測定する試薬、として利用することができる。これらの利用方法は、後述する精製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いる場合と基本的には同じである。

【0026】

インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製は、免疫グロブリン部分の性質を利用してプロテインAカラム担体を用いる定法に従って達成できる。また、 α 鎖または β 鎖に対する抗体を用いる親和性クロマトグラフィーの手法を利用してもよい。さらに、リガンドを担体に結合した親和性クロマトグラフィーの手法により精製することもできる。一般的なクロマトグラフィーの方法を組み合わせることもできる。インテグリン分子をこれらの方法で精製した公知例 (Pytela, R. et al. *Methods Enzymol.* 144, 475-489 (1987)、Santoro, S. A. et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 153, 217-223 (1988)、Charo, I. F. et al. *J. Cell Biol.* 111, 2795-2800 (1990)、Makarem, R. et al. *J. Biol. Chem.* 269, 4005-4011 (1994)、Pfaff, M. et al. *Eur. J. Immunol.* 225, 975-984 (1994)、Gulino, D. et al. *Eur. J. Biochem.* 227, 108-115 (1995)など) を応用すれば、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製は達成できる。

【0027】

精製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は、SDS-PAGEにより非還元下で少なくとも1本のバンドを示し、還元下で少なくとも2本のバンドを示す蛋白質として同定できる。また、これによりヘテロダイマーが免疫グロブリン重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを確認できる。まれに、還元下で複数のバンドが検出できることがあるが、これは α 鎖の分子内切断が起こっているためと考えられる。特に $\alpha 4$ でこの現象が知られている (Hemler, M. E. et al. *J. Biol. Chem.* 262, 11478-11485 (1987))。さらに、それぞれのバンドがキメラ蛋白質であることは、ウエスタンブロ

ッティングなどの方法により確認できる。別の方法として、得られた分子がインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることは、前述の抗 α 鎖抗体、抗 β 鎖抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体を組み合わせたELISAにより確認できる。つまりすべての抗体に対するエピトープを持つ蛋白質分子として同定できる。さらに別の方法として、免疫沈降によってインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を同定することもできる。この場合には、精製した蛋白質を公知の方法を用いて ^{35}S または ^{125}I またはビオチンなどでラベル化した後、抗 α 鎖抗体、抗 β 鎖抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いて免疫沈降するといずれの場合にも同じ電気泳動パターンが得られることで、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が目的とする構造をとっていることを確認することができる。さらに、細胞膜上のインテグリン複合体が解離する条件、例えばEDTAの共存や、SDSの存在下での煮沸などの操作を加えても免疫沈降パターンが変化しないことから、得られたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質が構造的に安定化された複合体であることを確認できる。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の確認方法はこれらによって限定されるものではない。

【0028】

調製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドとの結合は以下のように試験することができる。リガンドとインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を接触させて混合物を作製した後に、リガンドに結合したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の量またはインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に結合したリガンド量を測定する。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量の測定は、複合体自身を蛍光色素または酵素またはラジオアイソトープなどで標識しておくことで行うことができる。リガンド量の測定も同様の手法で行うことができる。SPA（アマシャム社）のような検出方法を利用して測定することもできる。さらに、蛍光色素、酵素、ラジオアイソトープなどで標識した複合体またはリガンドを認識する試薬を利用して測定することもできる。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダ

イマー複合体を認識する試薬としては、例えば抗ヒト免疫グロブリン抗体がある。本試験においては、検出される分子を何らかの担体、例えばビーズやプレート、に結合させておくことが好ましい。また、リガンドは分子全体だけでなく、インテグリンとの結合活性を保持する一部分を取り出して使用することもできる。例えば、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ については、そのリガンドであるフィブロネクチンやそのペプチド断片を担体に結合させて使用することができる。

【0029】

上記と同様の手法を用いて、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と細胞との結合を試験することができる。複合体に結合した細胞量の測定は、細胞を蛍光色素またはラジオアイソトープで標識するか、あるいは細胞と反応する試薬、例えば表面抗原と反応する抗体を利用することで行う。細胞の代わりに、組織切片のようなものを用いた場合は、結合するインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量を前記のいずれかの方法により測定することになる。

【0030】

これまでに述べたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドまたは細胞との結合を調べる方法は、そのままインテグリンとリガンドとの結合を阻害する物質、例えば抗体、ポリペプチド、ペプチド、低分子化合物を取得することに利用できる。好ましくは、被検物とインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体をあらかじめ混合したのちに上記の測定系にてインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複体のリガンドへの結合量を測定する。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複体の結合量が、ある被検物質を加えて下がるようであれば、その被検物質に阻害活性があると判断できる。ただしこの系では、金属イオンキレート作用を持つ物質や界面活性作用を持つ物質などが擬陽性の結果をもたらす可能性がある。

【0031】

これまでに、精製したインテグリンをプレートに固相化し、結合するペプチドを探索した例が報告されている (Healy, J. M. et al. Biochemistry 34, 3948-

3955 (1995)、Koivunen, E. et al. J. Cell Biol. 124, 373-380 (1994))。本発明で得られるインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いても、同様にインテグリンに結合する物質を探索することができる。特に、本発明のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いた場合には、非特異的に結合した物質を除去するための操作をより厳しい条件で行いうることから、操作の簡略化がはかられる利点がある。また、操作途中の複合体の解離がないことから、より特異的に結合物質を選択できる利点がある。結合物質を選択するソースに適したものとして、ファージペプチドライブラリー（例えばScott, J. K. and Smith, G. P. Science 249, 386-390 (1990)、Daniels, D. and Lane, D. P. Exp. Opin. Ther. Patents 5, 901-912 (1995)）やDNAオリゴマーのライブラリー（例えばO'Connell, D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5883-5887 (1996)）が知られているが、本発明においては前者を用いることが好ましい。

【0032】

インテグリンとそのリガンドとの接着反応は様々な病態において重要な役割を果たすことが推定されており、実際に医薬品開発のターゲットになっている（Drug and Market Dev. 6, 201-205 (1995)）。本発明で得られるインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体はそのまま医薬として用いることもできる。中でも $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンは自己免疫疾患、慢性の炎症性疾患、アレルギー性疾患、臓器移植拒絶で重要な役割を果たすことが知られており（Lobb, R. R. and Hemler, M. E. J. Clin. Invest. 94, 1722-1728 (1994)）、本発明で得られる $\alpha 4 \beta 1$ のインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体からなる医薬はそれら疾患の有用な治療薬となりうる。

【0033】

さらに前記のインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドあるいは細胞の結合を試験する方法は、体液や組織中でのインテグリンのリガンド量の変化を測定する試薬として利用できる。

【0034】

【実施例】

以下、本発明をより詳しく説明するために実施例をあげるが、本発明はこれらに限定されるものではない。一般的な組み換えDNA実験の手法は成書の方法（"Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York）に準じた。

【0035】

実施例1

ヒトIgG₁重鎖発現ベクターの作製

ヒトIgG₁ゲノム遺伝子は、報告された塩基配列情報（Ellison, J. W. et al. Nucleic Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)）に基づくハイブリダイゼーションcDNAプローブを用い、ヒトゲノムライブラリー（CLONTECH）から上述の配列情報に一致するクローンを取得した。これをPCRの鋳型DNAとした。ヒトIgG₁遺伝子のヒンジ領域（H）と定常領域部分（CH2とCH3）を含むDNA断片を増幅するためのプライマーとしてBamH I制限サイトを挿入した配列表の配列番号4（以下、配列表の配列番号を、配列番号と略す）、Xba I 制限サイトを挿入した配列番号5に示すDNAオリゴマーを合成した。

5' -GCGGATCCCGAGCTGCTGGAAGCAGGCTCAG-3' (配列番号4)

5' -CCTCTAGACGGCCGTCGCACTCATTTA-3' (配列番号5)

【0036】

鋳型DNA、プライマー、dNTPs（dATP、dCTP、dGTP、dTTP等モル混合液）、Taqポリメラーゼ（Takara）をPCR緩衝液（10 mM Tris-HCl、500 mM KCl、15 mM MgCl₂、0.01% gelatin pH8.3）中で混合したのち、サーマルサイクラー（Perkin Elmer Cetus）にて、DNA変性を94℃で1分、プライマーのアニーリングを58℃で2分、プライマーの伸長を72℃で3分を30サイクル行った。増幅したDNAを制限酵素BamH IおよびXba Iで消化後、常法（"Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York）に従い、1%アガロースゲルにてDNA断片を精製した。これを制限酵素BamH IおよびXba Iで消化して精製

したpBluescript SK (+) (STRATAGENE) の大DNA断片とT4 DNAリガーゼを用いて連結した。このプラスミドDNAを用いて大腸菌 (JM109) を形質転換し、形質転換株を選択してプラスミドDNA (IgG₁ Bluescript) を得た。次に、発現ベクターpcDL-SR α 296を制限酵素BamH Iで消化後、T4 DNAポリメラーゼ処理にて平滑端とし、Not I リンカーを連結した。これを、制限酵素Not I およびXho I 消化した大DNA断片とIgG₁ Bluescriptを制限酵素Not I およびXho I 消化した小DNA断片を常法に従って精製し、両DNA断片をT4 DNAリガーゼで連結した。これを大腸菌 (HB101) に形質転換した後に形質転換株を選択してプラスミドDNAを得た。以下、該プラスミド (IgG₁ SR α) をヒトIgG₁ 発現ベクターと呼ぶ。なお、以後の実施例で述べる遺伝子組み換えの基本的な操作は上記と同様であるので簡略に述べる。

【0037】

実施例2

インテグリン α 4・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン α 4の細胞外部分を暗号化するDNA断片は、既報のcDNA配列情報 (Takada, Y. et al. EMBO J. 8, 1361-1368 (1989)) をもとにクローニングした。配列番号1の1801塩基位の制限サイトEcoR I、112塩基位の制限サイトStu I、2949塩基位の制限サイトBamH Iを連結に利用し、N端翻訳開始点からStu I 切断部位を α 4-1、Stu I からEcoR I切断部位を α 4-2、EcoR IからBamH I切断部位を α 4-3とし、これを連結することによって得た。以下に具体的な方法を示す。

【0038】

α 4-1を暗号化する部分は配列番号6~9のDNAオリゴマーを連結してクローニングする設計とし、配列番号6~9に示すDNAオリゴマーを合成した。配列番号6、7には、ベクターへの連結のためにN端を暗号化する側に制限サイトXba I を付加した。また、既知配列情報と比較して配列番号1の60、63、64位の塩基をC \rightarrow T、C \rightarrow A、C \rightarrow Gに置換、112、114位の塩基をC \rightarrow A、C \rightarrow Gに置換した。112、114位の置換により、配列番号：8、9のN

端を暗号化する側に制限サイトStu I を挿入した。合成したオリゴマーの5' 末端をリン酸化、アニーリングした後、T4 DNAリガーゼを用いて連結した。連結後、制限酵素Xba I とStu I で切断し、5%アガロース (NuSieve GTG agarose、FMC) ゲルにて電気泳動し、目的とする約120bpのDNA断片 ($\alpha 4-1$) を切り出して、精製した。

【0039】

5' -CTAGACCACCATGTTCCCCACCGAGAGCGCATGGCTTGGGAAGCGAGGCGGAACCCGGGCCCCCGGA

GCTGCA-3'

(配列番号6)

5' -GCTTCGGGGCCCGGGTTTCGCGCCTCGCTTCCCAAGCCATGCGCTCTCGGTGGGGAACATGGTGGT-3'

(配列番号7)

5' -CTCCGGGAGACGGTGATGCTGTTGCTGTGCCTGGGGTCCCGACCGGCAGG-3'

(配列番号8)

5' -CCTGCCGGTCCGGACCCCCAGGCACAGCAACAGCATCACCGTCTCCCGGAGTCGA-3'

(配列番号9)

【0040】

次に、インテグリン $\alpha 4$ 発現細胞であるヒト骨肉腫細胞株MG63 (ATCC CRL 1427) のRNAを分離し、オリゴdTセルロースカラム (NEB) を用いてPolyA (+) RNAを精製した。これをもとに逆転写酵素 (GIBCO) を用いて1本鎖cDNAを合成し、PCRの鋳型として使用した。 $\alpha 4-2$ 、 $\alpha 4-3$ のDNAを増幅するプライマーとして、Pst I、Stu I 制限サイト (配列番号10)、BamH I制限サイト (配列番号13) を挿入した配列番号10~13の4本のDNAオリゴマーを合成した。

【0041】

5' -CACTGCAGGCAGGCCTTACAACGTGGACACTGAGAGC-3'

(配列番号10)

5' -GCAGAAACCTGTAAATCAGCAG-3'

(配列番号11)

5' -GCATTTATGCGGAAAGATGTGC-3'

(配列番号12)

5' -CGGGATCCGTGAAATAACGTTTGGGTCTT-3'

(配列番号13)

鋳型cDNAとプライマー、dNTPs、TaqポリメラーゼをPCR緩衝液

中で混合したのち、サーマルサイクラーにて、DNA変性を94℃で1分、プライマーのアニーリングを58℃で2分、プライマーの伸長を72℃で3分を30サイクル行った。増幅した $\alpha 4-2$ 、 $\alpha 4-3$ のDNA断片をそれぞれPst I およびEcoR I、EcoR IおよびBamH Iで消化後、pBlue script KS (+) (STRATAGENE) にサブクローニングし、プラスミドDNA (以下、 $\alpha 4-2$ Blue script、 $\alpha 4-3$ Blue script) を調製した。次に、 $\alpha 4-2$ Blue scriptの上流に、Xba I およびStu I 制限サイトを利用して $\alpha 4-1$ を連結し、プラスミドDNA (以下、 $\alpha 4-1-2$ Blue script) を調製した。

【0042】

$\alpha 4-1-2$ Blue script を、制限酵素Not Iで消化後T4 DNAポリメラーゼ処理にて平滑末端としたのち、制限酵素EcoR Iで消化し、小DNA断片を調製した。 $\alpha 4-3$ Blue script は、制限酵素EcoR IおよびBamH Iで消化して、小DNA断片を精製した。次に、この2つの小DNA断片を、IgG₁SR α を制限酵素EcoR VおよびBamH Iで消化して得られる大DNA断片に同時に連結し、プラスミドDNAを得た。得られたインテグリン $\alpha 4 \cdot$ IgG重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号1に示す。以下、該プラスミド (インテグリン $\alpha 4 \cdot$ IgGSR α) を、インテグリン $\alpha 4 \cdot$ IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

【0043】

実施例3

インテグリン $\beta 1 \cdot$ IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン $\beta 1$ 発現細胞として、ヒト繊維芽細胞株MRC5 (ATCC CCL 171) のRNAを分離し、オリゴdTセルロースカラムを用いてPoly A (+) RNAを精製した。これをもとに逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成し、PCRの鋳型として使用した。プライマーとして、配列情報 (Scott Argraves, W. et al. J. Cell Biol. 105, 1183-1190 (1987)) に従い、C端を暗号化する側にBamH I制限サイト (配列番号15) を挿入して配列番号: 14 および15の2本のDNAオリゴマーを合成した。

【0044】

5' -GCGGAAAAGATGAATTTACAAC-3'

(配列番号14)

5' -GTGGGATCCTCTGGACCAGTGGGACAC-3'

(配列番号15)

【0045】

鋳型cDNA、プライマー、dNTPs、TaqポリメラーゼをPCR緩衝液中で混合したのち、サーマルサイクラーにて、DNA変性を94℃で1分、プライマーのアニーリングを57℃で2分、プライマーの伸長を72℃で3分を30サイクル行った。増幅したDNAを、T4DNAポリメラーゼ処理により末端を平滑化したのち、制限酵素BamH Iで消化後DNA断片を精製した。次に、pBlue-script KS (+) のSma I およびBamH Iサイトに、先のPCRで得たDNA断片をサブクローニングした。さらにこれを、制限酵素EcoR IおよびBamH Iで消化して精製した小DNA断片を、制限酵素EcoR IおよびBamH I処理したIgG₁SR α の大DNA断片に挿入し、プラスミドDNAを得た。得られたインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号2に示す。以下該プラスミド(インテグリン β 1・IgGSR α)をインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

【0046】

実施例4

インテグリン α 4・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターおよびインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの動物細胞への導入と発現

インテグリン β 1・IgG重鎖キメラ発現ベクターであるインテグリン β 1・IgGSR α とpSV2dhfr (BRL)を10:1の割合で混合し、これとリポフェクチン試薬(GIBCO BRL)を緩やかに混合して室温15分間静置後、ジヒドロ葉酸リダクターゼ欠損CHO細胞(ATCC CRL 9096)に滴下した。滴下18時間後に培養培地(10%FBS(GIBCO)、核酸含有 α MEM培地(GIBCO BRL))に交換して約2日間培養したのち、トリプシン-EDTA処理にて細胞を分散し、第一選択培地(10%FBS含有核酸不含 α MEM培地(GIBCO BRL))に懸濁して、96ウェルプレート(CORNING)中で約10日間選択培養した。培養上清中に産生されるイン

テグリン $\beta 1$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質量をELISA法（後述）により測定し、最も高い産生量を示すクローンを、限界希釈法によるクローニングにより安定化した。

【0047】

次に、安定化したインテグリン $\beta 1$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質産生CHO細胞に、上記と同様のリポフェクチン法によりインテグリン $\alpha 4$ ・IgG重鎖キメラ発現ベクターを形質移入した。簡単には、インテグリン $\alpha 4$ ・IgGSR α とpSV2neo（BRL）を10:1で混合し、これをリポフェクチン試薬と混合したのち、細胞に滴下した。滴下18時間後に先の第一選択培地に交換して約2日間培養した後、トリプシン-EDTA処理にて細胞を分散し、第二選択培地（10%FBS（GIBCO）、1mg/ml neomycin（GIBCO）を含有する核酸不含 α MEM培地（GIBCO BRL））に懸濁し、96ウェルプレート（CORNING）にて耐性細胞を約10日間選択培養した。培養上清中に産生されるインテグリン $\alpha 4$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質量とインテグリン $\beta 1$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質量をELISA法（後述）により測定し、両キメラ蛋白質の産生量がほぼ同等のクローンをピックアップした。このクローンを、限界希釈法により2回クローニングし、 $\alpha 4$ ・IgG重鎖- $\beta 1$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生するクローンとして安定化した。

【0048】

実施例5

ELISA法によるインテグリン $\alpha 4$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質およびインテグリン $\beta 1$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質産生量の測定

抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体（Becton&Dickinson、クローンL25.3）、または抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体（Coulter、クローン4B4）2 μ g/mlを96穴イムノプレート（NUNC）に50 μ l/ウェルずついれ、4℃、16時間静置した。その後、各ウェルをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（日水製薬、Caイオン、Mgイオン不含、以下PBS（-））にて2回洗浄し、25%ブロックエース（雪印乳業）含有PBS（-）にて非特異反応をブロックした。ブロッキング後、選択培養により増殖したCHO細胞の培養

上清を適宜希釈して室温で抗体と1時間反応させた。反応後、0.02% Tween含有PBS (-) (以下T-PBS) で2回洗浄した。次にビオチン化抗ヒトIgG抗体と1時間反応後、T-PBSで2回洗浄し、続いてアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼと1時間反応後、PBS (-) で2回洗浄した。PBS (-) を完全に吸引したのち、オルトフェニレンジアミンを基質として発色させ、マイクロプレートリーダー (Bio-rad NOVAPATH) を用いて490nmの吸光度を測定し、高い吸光度を示すクローンを選択した。

【0049】

実施例6

$\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製
(1) CHO細胞の培養と培養上清の調製

$\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を高産生するCHO細胞を、5%FBS (Ultra-low IgGグレード、GIBCO) を含む核酸不含 α MEM培地 (以下 α MEM (-) 培地、GIBCO BRL) で1日培養し、セミコンフルエントとなった細胞を1%FBS (Ultra-low IgGグレード) を含む α MEM (-) 培地に交換して3日間培養したのち、培養上清を回収した。これをPrep-scale (Millipore) を用いた限外濾過により1/10容量まで濃縮し、最終濃度5mMとなるように1M HEPES溶液 (pH 8.0) を加えて精製原液とした。

【0050】

(2) プロテインAカラムクロマトグラフィー

精製原液を、Prosep Guard担体 (bioPROCESSING) カラムに通過させたのち、Prosep A担体 (bioPROCESSING) カラムにアプライした。アプライ終了後、カラム体積の10倍容量のPBS (-) で洗浄し、続いて0.1Mクエン酸緩衝液 pH 6~3のグラジエントで蛋白質を溶出した。pH 3で溶出されるピーク画分を回収、1M Tris-HCl溶液 (pH 8.5) を0.1容量加えて中和後、PBS (-) に対して透析した。

【0051】

(3) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

FMP活性化セルロファイン（生化学工業）をカップリング緩衝液（50 mM Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 8.5）で平衡化したのち、ペプチド合成機で合成した配列番号3に示すペプチド（以下CS-1ペプチド）を加え、4℃、16時間転倒混和した。

【0052】

Cys Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr （配列番号3）
混和後、カップリング緩衝液で洗浄し、ブロッキング緩衝液（0.1 mM monoethanolamine、50 mM Tris-HCl pH 8.0）を加えてさらに室温で6時間転倒混和した。その後、TBS溶液（150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、1 mM MnCl₂、pH 7.5）で十分に洗浄してCS-1ペプチド結合セルロファインカラムを作製した。このカラムに、精製原液をアプライして室温で3時間静置したのち、カラム体積の10倍容量の洗浄緩衝液（1 M NaCl、0.1 % Triton、20 mM Tris-HCl、1 mM MnCl₂ pH 7.5）と同容量のTBS溶液で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液（10 mM EDTA、150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 7.5）を用いてCS-1カラムに結合した蛋白質を溶出した。溶出液を回収後、PBS（-）に対して透析した。

【0053】

（4）SDS-PAGE

（3）の溶出画分を6.0または7.0%アクリルアミドゲルを用い、非還元下または還元下でSDS-PAGEを行ったのち、ゲルをクマシー染色した。その結果を図1に示した。非還元下では、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とその多量体と考えられる2本のバンドが認められた。また、還元下では、インテグリン $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質とインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質と考えられる2本のバンド（170 kDa、135 kDa）およびインテグリン $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質の分子内切断（Hemler, M. E. et al. J. Biol. Chem. 262, 11478-11485 (1987)）に由来すると考えられる2本のバンド（80 kDa、90 kDa）が認められた。これらの結果は、（3）の溶出蛋白質が、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる分子構造を有しており、しかもヘテロダイマーを構成する分子どうしがIgG重鎖間のジスルフィド結合により連

結されていることを示唆している。

【0054】

実施例7

$\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の同定と構造的安定性の検討

(1) 抗インテグリン抗体を用いる免疫沈降と陽イオンキレート剤の影響

基本的な方法は成書 ("Antibodies" Harlow E. et al. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) に従った。簡単には、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる実施例6(3)の溶出蛋白質をlactoperoxidase法を用いて ^{125}I ラベル化した。次に、Affigel-10 (Bio-rad)を0.1M HEPES溶液(pH 8.0)にて洗浄したのち、正常マウスIgG、抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体(クローン11C2B)および抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体(クローン4B4)を加えて4℃で16時間反応させて共有結合させ、正常マウスIgGビーズ、および各抗体ビーズを作製した。次に、 ^{125}I 標識 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、正常マウスIgGビーズと4℃、4時間転倒混和してプレクリアーしたのち、抗体ビーズと4℃、16時間転倒混和した。混和後、ビーズを洗浄緩衝液(200 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl、0.1 % NP-40、1 mM MgCl_2 または10 mM EDTA pH 8.0)にて3回洗浄した。洗浄後、ビーズに電気泳動用サンプルバッファーを加えて100℃で5分間処理し、遠心分離した後の上清を還元下で電気泳動した。泳動後、ゲルドライヤーにてゲルを乾燥させ、蛋白質をオートラジオグラフィーにて検出し、その結果を図2に示した。

【0055】

1 mM MgCl_2 存在下における免疫沈降の結果、抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体と抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体の両ビーズから、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体構造から期待される同一の沈降パターンが得られた。これにより、実施例6の(3)で得られた蛋白質が $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることを同定した。

【0056】

一方、10 mM EDTA 存在下での抗インテグリン $\beta 1$ 抗体ビーズを用いた免疫沈降のパターンは、1 mM $MgCl_2$ 存在下と同様であり、インテグリン $\alpha 4 \cdot IgG$ 重鎖キメラ蛋白質とインテグリン $\beta 1 \cdot IgG$ 重鎖キメラ蛋白質との会合が、陽イオン依存性ではないことを明らかにした。以上の結果は、実施例 6 (3) で得た溶出蛋白が確かに $\alpha 4 \cdot IgG$ 重鎖- $\beta 1 \cdot IgG$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることを示すとともに、実施例 6 (4) の結果とあわせて、両蛋白質の会合が IgG 重鎖間のジスルフィド結合を介した安定な会合であることを強く示唆している。

【0057】

(2) $\alpha 4 \cdot IgG$ 重鎖- $\beta 1 \cdot IgG$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体のシーケンシャル免疫沈降による構造的安定性の検討

(1) に従って ^{125}I 標識 $\alpha 4 \cdot IgG$ 重鎖- $\beta 1 \cdot IgG$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と、正常マウス IgG ビーズ、抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体 (11C2B) ビーズ、抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体 (4B4) ビーズを、4℃、4 時間反応させた後に洗浄した。洗浄後、2% SDS 存在下で 100℃、5 分間煮沸し、遠心分離した後の上清 (第 1 次免疫沈降サンプル) を 1% BSA 含有 PBS で 10 倍希釈し、再度抗インテグリン $\beta 1$ 抗体、抗インテグリン $\alpha 4$ 抗体ビーズと 4℃、16 時間反応させた。反応後ビーズを洗浄し、電気泳動用サンプルバッファーを加え、100℃、5 分間処理し、遠心分離した後の上清 (第 2 次免疫沈降サンプル) を、SDS-PAGE/オートラジオグラフィーを行った。

【0058】

その結果、図 3 に示すように、第 1 次免疫沈降により得られた電気泳動パターンは、第 2 次免疫沈降においても同様に認められることを確認した。この結果は、 $\alpha 4 \cdot IgG$ 重鎖- $\beta 1 \cdot IgG$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体における $\alpha 4 \cdot IgG$ 重鎖キメラ蛋白質と $\beta 1 \cdot IgG$ 重鎖キメラ蛋白質の会合が、2% SDS 存在下での煮沸においても解離しないことを示しており、ジスルフィド結合による安定なヘテロダイマーを形成を強く支持するものである。

【0059】

実施例 8

$\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体のVCAM-1への結合

CHO細胞から産生される $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、細胞膜上のインテグリン $\alpha 4 \beta 1$ のリガンドに対する結合能を有することをVCAM-1を発現する細胞への結合能で調べた。ヒトの正常さい帯静脈血管内皮細胞をIL-13 U/mlで16時間培養してVCAM-1発現細胞を調製した。この細胞を、1 mM EDTAで37℃、15分間処理して単一細胞に分散した。この細胞をサンプルチューブあたり 2×10^5 個に対し、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生するCHO細胞の培養上清と、最終濃度1 mM MnCl_2 または3 mM EDTA存在下で30分間反応させた。反応後、結合測定用緩衝液(24 mM Tris-HCl、10 mM Hepes、150 mM NaCl、1 mM MnCl_2 または1 mM EDTA、1% BSA、2 mM Glucose pH 7.4)を用いて1200 rpmで室温、5分間の遠心分離により2回洗浄した。洗浄後、FITC標識抗ヒトIgG抗体(Cappel)を加え、室温で20分間反応後、同緩衝液で細胞を洗浄し、フローサイトメーター(ELITE、Coulter)にて測定した。

【0060】

結果を図4に示す。 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む培養上清とVCAM-1発現細胞を反応させることにより、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合を示す蛍光強度の増加が認められた。この結合は抗ヒトインテグリン抗体(抗 $\alpha 4$ 抗体:クローンL25、3、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +抗 $\beta 1$ 抗体:クローン4B4、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、および3 mM EDTAの添加により阻害された。この結果は、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、VCAM-1に対して結合能をもつこと、この結合が陽イオン依存性であることを示す。従って、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、細胞膜上のインテグリン $\alpha 4 \beta 1$ と同様にリガンドであるVC

AM-1に対する結合能を有すること、結合の特徴である陽イオン依存性を保持していることを示す。

【0061】

実施例9

フィブロネクチン上のペプチド断片に対する $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合

次に、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ のもうひとつのリガンドであるフィブロネクチン上のペプチド断片（配列番号3）に対する $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合能についても検討した。

【0062】

まず、前記の報告（Humphries, M.J. et al. J. Biol.Chem. 262, 6886-6892 (1987)）に従って、配列番号3のペプチド断片（CS-1ペプチド）をラビット IgG （Sigma）に結合させて、CS-1-IgGを作製した。このCS-1-IgGをPBS（-）で希釈したのち、96穴イムノプレート（NUNC）に $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ入れ、 4°C 、16時間静置することによりプレートに固相化した。

【0063】

静置後、PBS（-）にて2回洗浄し、 80°C 、10分間加熱処理により熱変性処理した1%BSA-PBS溶液を $300 \mu\text{l}$ /ウェルずつ入れて 4°C 、3時間処理することにより非特異反応をブロッキングした。次に、固相化したCS-1-IgGと $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含むCHO培養上清（ $100 \mu\text{l}$ ）を 30°C 、3時間反応させた。非結合 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、0.1%BSA含有TBS緩衝液（150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl、1 mM MnCl_2 pH 7.4）で2回洗浄除去し、結合した $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、1次抗体としてビオチン標識抗ヒト IgG 抗体（Vector）、2次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ（Sigma）と結合させた後、TBS緩衝液で洗浄した。これに、基質としてオルトフェニレンジアミンを加え、発色後490 nmで吸光度を測定した。

【0064】

その結果を図5に示す。 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と反応させることにより、CS-1ペプチドへの結合を示す吸光度の上昇がみられたが、この結合は、抗インテグリン $\alpha 4$ 抗体（クローンL25.3）、抗インテグリン $\beta 1$ 抗体（クローン4B4）、5 mM EDTAの存在下ではほぼ完全に阻害された。従って、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、フィブロネクチン上のペプチド断片であるCS-1ペプチドに対しても結合能を有すること、陽イオン依存性という特徴が維持されていることが明らかとなった。

【0065】

実施例10

フィブロネクチン上のペプチド断片に対する $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合測定系を利用した阻害ペプチドの評価

実施例9の結合測定系において配列番号16（以下GPEILDVPST）、17（以下GPEILEVPST）、18（以下GRGDSP）の3種のペプチドの効果を検討した。

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr (配列番号16)

Gly Pro Glu Ile Leu Glu Val Pro Ser Thr (配列番号17)

Gly Arg Gly Asp Ser Pro (配列番号18)

【0066】

各々のペプチドはペプチド合成機で合成した。各ペプチドと $\alpha 4 \text{ IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含むCHO培養上清100 μ lを室温で20分間混合した後、実施例9の方法に従ってCS-1-IgGへの結合を測定した。その結果を図6に示す。GPEILDVPSTは、0.1~10 μ g/mlにおいて濃度依存的な阻害活性を示したが、GPEILEVPST、GRGDSPによる結合阻害は認められなかった。この結果は、実施例9の結合測定系が、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ とCS-1ペプチドとの結合を阻害するペプチド（GPEILDVPST）の効果を特異的に検出できる系であることを示している。

【0067】

実施例11

インテグリン $\alpha 2$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン $\alpha 2$ の細胞外部分を暗号化するDNA断片は、既報のcDNA配列情報 (Takada, Y. et al. J. Cell. Biol. 109, 397-407 (1989)) をもとに、 $\alpha 2-1$ と $\alpha 2-2$ に分割してサブクローニングし、発現ベクター上で1本化した。まず、インテグリン $\alpha 2$ 発現細胞であるヒト線維芽細胞株MRC-5 (ATCC CCL 171) のRNAを分離し、オリゴdTセルロースカラムを用いてPolyA (+) RNAを精製した。これをもとに1本鎖cDNAを合成し、PCRの鋳型として使用した。PCRプライマーとして、 $\alpha 2-1$ は配列番号20と21、 $\alpha 2-2$ は配列番号22と23のDNAオリゴマーを合成して使用した。

【0068】

- | | |
|------------------------------------|----------|
| 5' -GCTCGAGCAAACCCAGCGCAACTACGG-3' | (配列番号20) |
| 5' -ATAGTGCCCTGATGACCATTG-3' | (配列番号21) |
| 5' -GATGGCTTTAATGATGTGATTG-3' | (配列番号22) |
| 5' -TGTTGGTACTTCGGCTTTCTC-3' | (配列番号23) |

【0069】

鋳型cDNAとプライマー、dNTPs、TaqポリメラーゼをPCR緩衝液中で混合後、サーマルサイクラーにて、PCR (反応条件: 94℃1分-60℃2分-72℃3分) を30サイクル行った。増幅した $\alpha 2-1$ のDNA断片は、制限酵素Xho I およびEcoR Iで消化して精製し、 $\alpha 2-2$ のDNA断片はT4 DNAポリメラーゼ処理により末端を平滑化したのち、制限酵素EcoR Iで消化して精製した。精製した2つのDNA断片をリン酸化反応液 (50 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、25 mM DTT、1 mM ATP、0.1 U/ μ l T4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara) pH 8.0) 中で37℃、1時間反応後、68℃、5分間熱処理して酵素を失活させた。次に、実施例1で作製したIgG₁SR α を制限酵素Bam HIで消化後、Klenow反応液 (66 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、0.2 mM dNTPs、0.05 U/ μ l Klenow fragment (Takara) pH

7.5) 中で37℃、30分間反応させて末端を平滑化し、70℃、5分間熱処理して酵素を失活させた。さらに制限酵素Xho Iで消化し、大DNA断片を精製した。この大DNA断片に、先にリン酸化した2つ($\alpha 2-1$ 、 $\alpha 2-2$)のDNA断片を挿入し、プラスミドDNAを得た。得られたインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号19に示す。以下該プラスミド(インテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgGSR}\alpha$)をインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

【0070】

実施例12

インテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターおよびインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの動物細胞への導入と発現

実施例4で作製し、安定化したインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質産生CHO細胞に、実施例4と同様のリポフェクチン法によりインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ発現ベクターを形質移入した。簡単には、インテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgGSR}\alpha$ とpSV2neo(BRL)を10:1で混合し、これをリポフェクチン試薬と混合したのち、細胞に滴下した。滴下18時間後に第一選択培地に交換して約2日間培養した後、トリプシン-EDTA処理にて細胞を分散し、第二選択培地に懸濁し、96ウェルプレートにて耐性細胞を約10日間選択培養した。培養上清中に産生されるインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質量とインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質量をELISA法(後述)により測定し、両キメラ蛋白質の産生量がほぼ同等のクローンをピックアップした。このクローンを、限界希釈法により2回クローニングし、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生するクローンとして安定化した。

【0071】

実施例13

ELISA法によるインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質およびインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質産生量の測定

抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体(Becton&Dickinson、クローン

P1E6)、または抗ヒトインテグリン β 1抗体(クローン4B4) $2\mu\text{g}/\text{ml}$ を96穴イムノプレートに $50\mu\text{l}/\text{ウェル}$ ずついれ、 4°C 、16時間静置した。その後、各ウェルをPBS(-)にて2回洗浄し、ブロッキング後、選択培養により増殖したCHO細胞の培養上清を適宜希釈して室温で抗体と1時間反応させた。反応後、T-PBSで2回洗浄し、ビオチン化抗ヒトIgG抗体と1時間、アビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼと1時間反応後、PBS(-)で2回洗浄した。洗浄後、オルトフェニレンジアミンを基質として発色させ、マイクロプレートリーダーを用いて 490nm の吸光度を測定し、高い吸光度を示すクローンを選択した。

【0072】

実施例14

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製
(1) CHO細胞の培養と培養上清の調製

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を高産生するCHO細胞を、5%FBS(Ultra-low IgGグレード)を含む αMEM (-)培地で1日培養し、セミコンフルエントとなった細胞を1%FBS(Ultra-low IgGグレード)を含む αMEM (-)培地に交換して3日間培養したのち、培養上清を回収した。これを限外濾過により1/10容量まで濃縮し、最終濃度5mMとなるように1M HEPES溶液(pH 8.0)を加えて精製原液とした。

【0073】

(2) プロテインAカラムクロマトグラフィー

精製原液を、Prosep Guard担体カラムを通過させたのち、Prosep A担体カラムにアプライした。アプライ終了後、カラム体積の10倍容量のPBS(-)で洗浄し、続いて0.1Mクエン酸緩衝液pH 6~3のグラジエントで蛋白質を溶出した。pH 3で溶出されるピーク画分を回収、1M Tris-HCl溶液(pH 8.5)を0.1容量加えて中和後、PBS(-)に対して透析した。

【0074】

(3) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

報告 (Kirchhofer, D. et al. J. Biol. Chem. 265, 615-618 (1990)) に従ってコラーゲン (Type I, Sigma) をcyanogen-bromide-activated sepharose (Sigma) にカップリングさせたコラーゲン固定化カラムを作製した。次に、精製原液をTBS緩衝液 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂ pH 7.5) に平衡化したのち、カラムにアプライして室温で3時間静置したのち、カラム体積の10倍容量の洗浄緩衝液 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 100 mM Octyl glucopyranoside pH 7.5) で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液 (20 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 50 mM Octyl glucopyranoside pH 7.5) を用いてカラムに結合した蛋白質を溶出した。溶出液を回収後、PBS (-) に対して透析した。

【0075】

(4) SDS-PAGE

(3) の溶出画分を7.0%アクリルアミドゲルを用い、非還元下または還元下でSDS-PAGEを行ったのち、ゲルをクマシー染色した。その結果を図7に示した。非還元下では、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられるバンドが認められた。また、還元下では、インテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質とインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質と考えられる2本のバンド (185 kDa, 135 kDa) が認められた。これらの結果は、溶出蛋白質が、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる分子構造であり、しかもIgG重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを示唆している。

【0076】

実施例 15

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の同定と構造的安定性の検討

実施例 14 (3) の溶出蛋白質を¹²⁵I ラベル化し、実施例 7 と同様に正常マウス IgG、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体 (クローン P1E6) および抗ヒトイ

ンテグリン β 1抗体（クローン4B4）ビーズを用いて免疫沈降を行い、還元下のSDS-PAGE／オートラジオグラフィーした。

【0077】

その結果、1 mM MgCl_2 または 10 mM EDTA のいずれにおいても、抗ヒトインテグリン α 2抗体と抗ヒトインテグリン β 1抗体の両ビーズから、 α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体構造から期待される同一の沈降パターンが得られた。この結果は、実施例14（3）で得た溶出蛋白が確かに α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることを示すとともに、実施例14（4）の結果とあわせて、両蛋白質の会合がIgG重鎖間のジスルフィド結合を介した安定な会合であることを強く示唆している。

【0078】

実施例16

コラーゲンに対する α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合性と特異性の検討

インテグリン α 2 β 1のリガンドであるコラーゲンに対する α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合性について検討した。

【0079】

まず、コラーゲン（Cell matrix TypeI 3 mg/ml）を0.02M酢酸溶液で0.1 μ g/mlとなるように希釈し、イムノプレートに100 μ l/ウェル入れて4℃、16時間保温した。保温後、コラーゲン溶液を吸引除去し、PBS（-）で2回洗浄して中和し、熱変性1%BSA-PBS溶液を300 μ l/ウェル入れ、室温で3時間ブロッキングした。ブロッキング後、PBS（-）で2度リンスして、コラーゲンコートプレートを作製した。

【0080】

α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含むCHO培養上清（100 μ l）を30℃、3時間反応させた。反応後、実施例9と同様に、 α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー

複合体の結合量を測定した。

【0081】

その結果、図8に示すように、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG重鎖} - \beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とコラーゲンの結合を示す吸光度の上昇が認められた。この結合は、各 $10 \mu\text{g/ml}$ の抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体（クローンP1E6）と抗インテグリン $\beta 1$ 抗体（クローン4B4）の共存下、および 5 mM EDTA の存在下でほぼ完全に阻害された。この結果から、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG重鎖} - \beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、細胞膜表面のインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と同様にコラーゲンに対する結合性をもつことを示すとともに、この結合が $\alpha 2 \cdot \text{IgG重鎖} - \beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に特異的なものであること、陽イオン依存性という結合の特徴も維持されていることが明らかとなった。

【0082】

【発明の効果】

本発明によりインテグリン分子の $\alpha 4$ と $\beta 1$ および $\alpha 2$ と $\beta 1$ の会合が構造的に安定化されたインテグリン $\alpha 4 \cdot \text{IgG重鎖} - \beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体およびインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG重鎖} - \beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が得られた。これらのヘテロダイマー複合体はインテグリン $\alpha 4 \beta 1$ およびインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ とリガンドとの結合測定やその結合を阻害する物質の探索、新規なリガンドを探索する試薬として利用する。また、これらのヘテロダイマー複合体は、炎症性疾患、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、血液疾患、細菌感染治療薬、循環器疾患治療薬等に利用できる。さらに血清中、組織中、体液中などに存在するそのリガンドを検出する試薬あるいは診断薬として利用できる。

【0083】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：4228

配列の型：核酸

配列

ATG TTC CCC ACC GAG AGC GCA TGG CTT GGG AAG CGA GGC GCG AAC CCG	48
Met Phe Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly Ala Asn Pro	
-35 -30 -25	
GGC CCC GAA GCT GCA CTC CGG GAG ACG GTG ATG CTG TTG CTG TGC CTG	96
Gly Pro Glu Ala Ala Leu Arg Glu Thr Val Met Leu Leu Leu Cys Leu	
-20 -15 -10	
GGG GTC CCG ACC GGC AGG CCT TAC AAC GTG GAC ACT GAG AGC GCG CTG	144
Gly Val Pro Thr Gly Arg Pro Tyr Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu	
-5 1 5	
CTT TAC CAG GGC CCC CAC AAC ACG CTG TTC GGC TAC TCG GTC GTG CTG	192
Leu Tyr Gln Gly Pro His Asn Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu	
10 15 20 25	
CAC AGC CAC GGG GCG AAC CGA TGG CTC CTA GTG GGT GCG CCC ACT GCC	240
His Ser His Gly Ala Asn Arg Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala	
30 35 40	
AAC TGG CTC GCC AAC GCT TCA GTG ATC AAT CCC GGG GCG ATT TAC AGA	288
Asn Trp Leu Ala Asn Ala Ser Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg	
45 50 55	
TGC AGG ATC GGA AAG AAT CCC GGC CAG ACG TGC GAA CAG CTC CAG CTG	336
Cys Arg Ile Gly Lys Asn Pro Gly Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu	
60 65 70	
GGT AGC CCT AAT GGA GAA CCT TGT GGA AAG ACT TGT TTG GAA GAG AGA	384
Gly Ser Pro Asn Gly Glu Pro Cys Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg	

75	80	85	
GAC AAT CAG TGG TTG GGG GTC ACA CTT TCC AGA CAG CCA GGA GAA AAT			432
Asp Asn Gln Trp Leu Gly Val Thr Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn			
90	95	100	105
GGA TCC ATC GTG ACT TGT GGG CAT AGA TGG AAA AAT ATA TTT TAC ATA			480
Gly Ser Ile Val Thr Cys Gly His Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile			
	110	115	120
AAG AAT GAA AAT AAG CTC CCC ACT GGT GGT TGC TAT GGA GTG CCC CCT			528
Lys Asn Glu Asn Lys Leu Pro Thr Gly Gly Cys Tyr Gly Val Pro Pro			
	125	130	135
GAT TTA CGA ACA GAA CTG AGT AAA AGA ATA GCT CCG TGT TAT CAA GAT			576
Asp Leu Arg Thr Glu Leu Ser Lys Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Asp			
	140	145	150
TAT GTG AAA AAA TTT GGA GAA AAT TTT GCA TCA TGT CAA GCT GGA ATA			624
Tyr Val Lys Lys Phe Gly Glu Asn Phe Ala Ser Cys Gln Ala Gly Ile			
	155	160	165
TCC AGT TTT TAC ACA AAG GAT TTA ATT GTG ATG GGG GCC CCA GGA TCA			672
Ser Ser Phe Tyr Thr Lys Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser			
170	175	180	185
TCT TAC TGG ACT GGC TCT CTT TTT GTC TAC AAT ATA ACT ACA AAT AAA			720
Ser Tyr Trp Thr Gly Ser Leu Phe Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys			
	190	195	200
TAC AAG GCT TTT TTA GAC AAA CAA AAT CAA GTA AAA TTT GGA AGT TAT			768
Tyr Lys Ala Phe Leu Asp Lys Gln Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr			
	205	210	215
TTA GGA TAT TCA GTC GGA GCT GGT CAT TTT CGG AGC CAG CAT ACT ACC			816
Leu Gly Tyr Ser Val Gly Ala Gly His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr			
	220	225	230
GAA GTA GTC GGA GGA GCT CCT CAA CAT GAG CAG ATT GGT AAG GCA TAT			864

Glu Val Val Gly Gly Ala Pro Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr	
235	240
ATA TTC AGC ATT GAT GAA AAA GAA CTA AAT ATC TTA CAT GAA ATG AAA	912
Ile Phe Ser Ile Asp Glu Lys Glu Leu Asn Ile Leu His Glu Met Lys	
250	255
GGT AAA AAG CTT GGA TCG TAC TTT GGA GCT TCT GTC TGT GCT GTG GAC	960
Gly Lys Lys Leu Gly Ser Tyr Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp	
270	275
CTC AAT GCA GAT GGC TTC TCA GAT CTG CTC GTG GGA GCA CCC ATG CAG	1008
Leu Asn Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln	
285	290
AGC ACC ATC AGA GAG GAA GGA AGA GTG TTT GTG TAC ATC AAC TCT GGC	1056
Ser Thr Ile Arg Glu Glu Gly Arg Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly	
300	305
TCG GGA GCA GTA ATG AAT GCA ATG GAA ACA AAC CTC GTT GGA AGT GAC	1104
Ser Gly Ala Val Met Asn Ala Met Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp	
315	320
AAA TAT GCT GCA AGA TTT GGG GAA TCT ATA GTT AAT CTT GGC GAC ATT	1152
Lys Tyr Ala Ala Arg Phe Gly Glu Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile	
330	335
GAC AAT GAT GGC TTT GAA GAT GTT GCT ATC GGA GCT CCA CAA GAA GAT	1200
Asp Asn Asp Gly Phe Glu Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp	
350	355
GAC TTG CAA GGT GCT ATT TAT ATT TAC AAT GGC CGT GCA GAT GGG ATC	1248
Asp Leu Gln Gly Ala Ile Tyr Ile Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile	
365	370
TCG TCA ACC TTC TCA CAG AGA ATT GAA GGA CTT CAG ATC AGC AAA TCG	1296
Ser Ser Thr Phe Ser Gln Arg Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser	
380	385
	390

TTA AGT ATG TTT GGA CAG TCT ATA TCA GGA CAA ATT GAT GCA GAT AAT	1344
Leu Ser Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn	
395 400 405	
AAT GGC TAT GTA GAT GTA GCA GTT GGT GCT TTT CGG TCT GAT TCT GCT	1392
Asn Gly Tyr Val Asp Val Ala Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala	
410 415 420 425	
GTC TTG CTA AGG ACA AGA CCT GTA GTA ATT GTT GAC GCT TCT TTA AGC	1440
Val Leu Leu Arg Thr Arg Pro Val Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser	
430 435 440	
CAC CCT GAG TCA GTA AAT AGA ACG AAA TTT GAC TGT GTT GAA AAT GGA	1488
His Pro Glu Ser Val Asn Arg Thr Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly	
445 450 455	
TGG CCT TCT GTG TGC ATA GAT CTA ACA CTT TGT TTC TCA TAT AAG GGC	1536
Trp Pro Ser Val Cys Ile Asp Leu Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly	
460 465 470	
AAG GAA GTT CCA GGT TAC ATT GTT TTG TTT TAT AAC ATG AGT TTG GAT	1584
Lys Glu Val Pro Gly Tyr Ile Val Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp	
475 480 485	
GTG AAC AGA AAG GCA GAG TCT CCA CCA AGA TTC TAT TTC TCT TCT AAT	1632
Val Asn Arg Lys Ala Glu Ser Pro Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn	
490 495 500 505	
GGA ACT TCT GAC GTG ATT ACA GGA AGC ATA CAG GTG TCC AGC AGA GAA	1680
Gly Thr Ser Asp Val Ile Thr Gly Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu	
510 515 520	
GCT AAC TGT AGA ACA CAT CAA GCA TTT ATG CGG AAA GAT GTG CGG GAC	1728
Ala Asn Cys Arg Thr His Gln Ala Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp	
525 530 535	
ATC CTC ACC CCA ATT CAG ATT GAA GCT GCT TAC CAC CTT GGT CCT CAT	1776
Ile Leu Thr Pro Ile Gln Ile Glu Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His	

540	545	550	
GTC ATC AGT AAA CGA AGT ACA GAG GAA TTC CCA CCA CTT CAG CCA ATT			1824
Val Ile Ser Lys Arg Ser Thr Glu Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile			
555	560	565	
CTT CAG CAG AAG AAA GAA AAA GAC ATA ATG AAA AAA ACA ATA AAC TTT			1872
Leu Gln Gln Lys Lys Glu Lys Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe			
570	575	580	585
GCA AGG TTT TGT GCC CAT GAA AAT TGT TCT GCT GAT TTA CAG GTT TCT			1920
Ala Arg Phe Cys Ala His Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser			
590	595	600	
GCA AAG ATT GGG TTT TTG AAG CCC CAT GAA AAT AAA ACA TAT CTT GCT			1968
Ala Lys Ile Gly Phe Leu Lys Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala			
605	610	615	
GTT GGG AGT ATG AAG ACA TTG ATG TTG AAT GTG TCC TTG TTT AAT GCT			2016
Val Gly Ser Met Lys Thr Leu Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala			
620	625	630	
GGA GAT GAT GCA TAT GAA ACG ACT CTA CAT GTC AAA CTA CCC GTG GGT			2064
Gly Asp Asp Ala Tyr Glu Thr Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly			
635	640	645	
CTT TAT TTC ATT AAG ATT TTA GAG CTG GAA GAG AAG CAA ATA AAC TGT			2112
Leu Tyr Phe Ile Lys Ile Leu Glu Leu Glu Glu Lys Gln Ile Asn Cys			
650	655	660	665
GAA GTC ACA GAT AAC TCT GGC GTG GTA CAA CTT GAC TGC AGT ATT GGC			2160
Glu Val Thr Asp Asn Ser Gly Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly			
670	675	680	
TAT ATA TAT GTA GAT CAT CTC TCA AGG ATA GAT ATT AGC TTT CTC CTG			2208
Tyr Ile Tyr Val Asp His Leu Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu			
685	690	695	
GAT GTG AGC TCA CTC AGC AGA GCG GAA GAG GAC CTC AGT ATC ACA GTG			2256

Asp Val Ser Ser Leu Ser Arg Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val	
700 705 710	
CAT GCT ACC TGT GAA AAT GAA GAG GAA ATG GAC AAT CTA AAG CAC AGC	2304
His Ala Thr Cys Glu Asn Glu Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser	
715 720 725	
AGA GTG ACT GTA GCA ATA CCT TTA AAA TAT GAG GTT AAG CTG ACT GTT	2352
Arg Val Thr Val Ala Ile Pro Leu Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val	
730 735 740 745	
CAT GGG TTT GTA AAC CCA ACT TCA TTT GTG TAT GGA TCA AAT GAT GAA	2400
His Gly Phe Val Asn Pro Thr Ser Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu	
750 755 760	
AAT GAG CCT GAA ACG TGC ATG GTG GAG AAA ATG AAC TTA ACT TTC CAT	2448
Asn Glu Pro Glu Thr Cys Met Val Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His	
765 770 775	
GTT ATC AAC ACT GGC AAT AGT ATG GCT CCC AAT GTT AGT GTG GAA ATA	2496
Val Ile Asn Thr Gly Asn Ser Met Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile	
780 785 790	
ATG GTA CCA AAT TCT TTT AGC CCC CAA ACT GAT AAG CTG TTC AAC ATT	2588
Met Val Pro Asn Ser Phe Ser Pro Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile	
795 800 805	
TTG GAT GTC CAG ACT ACT ACT GGA GAA TGC CAC TTT GAA AAT TAT CAA	2592
Leu Asp Val Gln Thr Thr Thr Gly Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln	
810 815 820 825	
AGA GTG TGT GCA TTA GAG CAG CAA AAG AGT GCA ATG CAG ACC TTG AAA	2640
Arg Val Cys Ala Leu Glu Gln Gln Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys	
830 835 840	
GGC ATA GTC CGG TTC TTG TCC AAG ACT GAT AAG AGG CTA TTG TAC TGC	2688
Gly Ile Val Arg Phe Leu Ser Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys	
845 850 855	

ATA AAA GCT GAT CCA CAT TGT TTA AAT TTC TTG TGT AAT TTT GGG AAA 2736

Ile Lys Ala Asp Pro His Cys Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys

860

865

870

ATG GAA AGT GGA AAA GAA GCC AGT GTT CAT ATC CAA CTG GAA GGC CGG 2784

Met Glu Ser Gly Lys Glu Ala Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg

875

880

885

CCA TCC ATT TTA GAA ATG GAT GAG ACT TCA GCA CTC AAG TTT GAA ATA 2832

Pro Ser Ile Leu Glu Met Asp Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile

890

895

900

905

AGA GCA ACA GGT TTT CCA GAG CCA AAT CCA AGA GTA ATT GAA CTA AAC 2880

Arg Ala Thr Gly Phe Pro Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn

910

915

920

AAG GAT GAG AAT GTT GCG CAT GTT CTA CTG GAA GGA CTA CAT CAT CAA 2928

Lys Asp Glu Asn Val Ala His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln

925

930

935

AGA CCC AAA CGT TAT TTC ACG GAT CCC GAG CTGCTGGAAG CAGGCTCAGC 2978

Arg Pro Lys Arg Tyr Phe Thr Asp Pro Glu

940

945

GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC AGGGCAGCAA GGCAGGCCCC 3039

GTCTGCCTCT TCACCCGGAG CCTCTGCCCC CCCCACTCAT GCTCAGGGAG AGGGTCTTCT 3098

GGCTTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCCCTGCACA 3158

CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC 3218

TGACCTAAGC CCACCCCAAA GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC 3278

CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC 3333

Glu Pro Lys Ser Cys Asp

950

AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG CCCAGGCCTC 3380

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

955

960

GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG GACAGGCCCC 3440

AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTCCTCA GCA CCT GAA CTC CTG 3493

Ala Pro Glu Leu Leu

965

GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC 3541

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

970

975

980

ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC 3589

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

985

990

995

CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG 3637

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

1000

1005

1010

1015

GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG 3685

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

1020

1025

1030

TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT 3733

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

1035

1040

1045

GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC 3781

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

1050

1055

1060

ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG 3828

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

1065

1070

AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC 3888

CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG 3937

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

1075

1080

CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC	3985
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
1085 1090 1095	
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC	4033
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
1100 1105 1110 1115	
AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAT	4081
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
1120 1125 1130	
TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC	4129
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
1135 1140 1145	
AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT	4177
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
1150 1155 1160	
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA	4225
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
1165 1170 1175	
TGA	4228

【0084】

配列番号：2

配列の長さ：3463

配列の型：核酸

配列

ATG AAT TTA CAA CCA ATT TTC TGG ATT GGA CTG ATC AGT TCA GTT TGC	48
Met Asn Leu Gln Pro Ile Phe Trp Ile Gly Leu Ile Ser Ser Val Cys	
-20 -15 -10 -5	
TGT GTG TTT GCT CAA ACA GAT GAA AAT AGA TGT TTA AAA GCA AAT GCC	96
Cys Val Phe Ala Gln Thr Asp Glu Asn Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala	

1	5	10	
AAA TCA TGT GGA GAA TGT ATA CAA GCA GGG CCA AAT TGT GGG TGG TGC	144		
Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys			
15	20	25	
ACA AAT TCA ACA TTT TTA CAG GAA GGA ATG CCT ACT TCT GCA CGA TGT	192		
Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys			
30	35	40	
GAT GAT TTA GAA GCC TTA AAA AAG AAG GGT TGC CCT CCA GAT GAC ATA	240		
Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile			
45	50	55	60
GAA AAT CCC AGA GGC TCC AAA GAT ATA AAG AAA AAT AAA AAT GTA ACC	288		
Glu Asn Pro Arg Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr			
65	70	75	
AAC CGT AGC AAA GGA ACA GCA GAG AAG CTC AAG CCA GAG GAT ATT CAT	336		
Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile His			
80	85	90	
CAG ATC CAA CCA CAG CAG TTG GTT TTG CGA TTA AGA TCA GGG GAG CCA	384		
Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro			
95	100	105	
CAG ACA TTT ACA TTA AAA TTC AAG AGA GCT GAA GAC TAT CCC ATT GAC	432		
Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp			
110	115	120	
CTC TAC TAC CTT ATG GAC CTG TCT TAT TCA ATG AAA GAC GAT TTG GAG	480		
Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu			
125	130	135	140
AAT GTA AAA AGT CTT GGA ACA GAT CTG ATG AAT GAA ATG AGG AGG ATT	528		
Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile			
145	150	155	
ACT TCG GAC TTC AGA ATT GGA TTT GGC TCA TTT GTG GAA AAG ACT GTG	576		

Thr Ser Asp Phe Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val	
160 165 170	
ATG CCT TAC ATT AGC ACA ACA CCA GCT AAG CTC AGG AAC CCT TGC ACA	624
Met Pro Tyr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr	
175 180 185	
AGT GAA CAG AAC TGC ACC ACC CCA TTT AGC TAC AAA AAT GTG CTC AGT	672
Ser Glu Gln Asn Cys Thr Thr Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser	
190 195 200	
CTT ACT AAT AAA GGA GAA GTA TTT AAT GAA CTT GTT GGA AAA CAG CGC	720
Leu Thr Asn Lys Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg	
205 210 215 220	
ATA TCT GGA AAT TTG GAT TCT CCA GAA GGT GGT TTC GAT GCC ATC ATG	768
Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met	
225 230 235	
CAA GTT GCA GTT TGT GGA TCA CTG ATT GGC TGG AGG AAT GTT ACA CGG	816
Gln Val Ala Val Cys Gly Ser Leu Ile Gly Trp Arg Asn Val Thr Arg	
240 245 250	
CTG CTG GTG TTT TCC ACA GAT GCC GGG TTT CAC TTT GCT GGA GAT GGG	864
Leu Leu Val Phe Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly	
255 260 265	
AAA CTT GGT GGC ATT GTT TTA CCA AAT GAT GGA CAA TGT CAC CTG GAA	912
Lys Leu Gly Gly Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu	
270 275 280	
AAT AAT ATG TAC ACA ATG AGC CAT TAT TAT GAT TAT CCT TCT ATT GCT	960
Asn Asn Met Tyr Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala	
285 290 295 300	
CAC CTT GTC CAG AAA CTG AGT GAA AAT AAT ATT CAG ACA ATT TTT GCA	1008
His Leu Val Gln Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala	
305 310 315	

GTT ACT GAA GAA TTT CAG CCT GTT TAC AAG GAG CTG AAA AAC TTG ATC	1056
Val Thr Glu Glu Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile	
320 325 330	
CCT AAG TCA GCA GTA GGA ACA TTA TCT GCA AAT TCT AGC AAT GTA ATT	1104
Pro Lys Ser Ala Val Gly Thr Leu Ser Ala Asn Ser Ser Asn Val Ile	
335 340 345	
CAG TTG ATC ATT GAT GCA TAC AAT TCC CTT TCC TCA GAA GTC ATT TTG	1152
Gln Leu Ile Ile Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Glu Val Ile Leu	
350 355 360	
GAA AAC GGC AAA TTG TCA GAA GGA GTA ACA ATA AGT TAC AAA TCT TAC	1200
Glu Asn Gly Lys Leu Ser Glu Gly Val Thr Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr	
365 370 375 380	
TGC AAG AAC GGG GTG AAT GGA ACA GGG GAA AAT GGA AGA AAA TGT TCC	1248
Cys Lys Asn Gly Val Asn Gly Thr Gly Glu Asn Gly Arg Lys Cys Ser	
385 390 395	
AAT ATT TCC ATT GGA GAT GAG GTT CAA TTT GAA ATT AGC ATA ACT TCA	1296
Asn Ile Ser Ile Gly Asp Glu Val Gln Phe Glu Ile Ser Ile Thr Ser	
400 405 410	
AAT AAG TGT CCA AAA AAG GAT TCT GAC AGC TTT AAA ATT AGG CCT CTG	1344
Asn Lys Cys Pro Lys Lys Asp Ser Asp Ser Phe Lys Ile Arg Pro Leu	
415 420 425	
GGC TTT ACG GAG GAA GTA GAG GTT ATT CTT CAG TAC ATC TGT GAA TGT	1392
Gly Phe Thr Glu Glu Val Glu Val Ile Leu Gln Tyr Ile Cys Glu Cys	
430 435 440	
GAA TGC CAA AGC GAA GGC ATC CCT GAA AGT CCC AAG TGT CAT GAA GGA	1440
Glu Cys Gln Ser Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Lys Cys His Glu Gly	
445 450 455 460	
AAT GGG ACA TTT GAG TGT GGC GCG TGC AGG TGC AAT GAA GGG CGT GTT	1488
Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val	

465	470	475	
GGT AGA CAT TGT GAA TGC AGC ACA GAT GAA GTT AAC AGT GAA GAC ATG			1536
Gly Arg His Cys Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met			
480	485	490	
GAT GCT TAC TGC AGG AAA GAA AAC AGT TCA GAA ATC TGC AGT AAC AAT			1584
Asp Ala Tyr Cys Arg Lys Glu Asn Ser Ser Glu Ile Cys Ser Asn Asn			
495	500	505	
GGA GAG TGC GTC TGC GGA CAG TGT GTT TGT AGG AAG AGG GAT AAT ACA			1632
Gly Glu Cys Val Cys Gly Gln Cys Val Cys Arg Lys Arg Asp Asn Thr			
510	515	520	
AAT GAA ATT TAT TCT GGC AAA TTC TGC GAG TGT GAT AAT TTC AAC TGT			1680
Asn Glu Ile Tyr Ser Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Asn Cys			
525	530	535	540
GAT AGA TCC AAT GGC TTA ATT TGT GGA GGA AAT GGT GTT TGC AAG TGT			1728
Asp Arg Ser Asn Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys			
545	550	555	
CGT GTG TGT GAG TGC AAC CCC AAC TAC ACT GGC AGT GCA TGT GAC TGT			1776
Arg Val Cys Glu Cys Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Ser Ala Cys Asp Cys			
560	565	570	
TCT TTG GAT ACT AGT ACT TGT GAA GCC AGC AAC GGA CAG ATC TGC AAT			1824
Ser Leu Asp Thr Ser Thr Cys Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Cys Asn			
575	580	585	
GGC CGG GGC ATC TGC GAG TGT GGT GTC TGT AAG TGT ACA GAT CCG AAG			1872
Gly Arg Gly Ile Cys Glu Cys Gly Val Cys Lys Cys Thr Asp Pro Lys			
590	595	600	
TTT CAA GGG CAA ACG TGT GAG ATG TGT CAG ACC TGC CTT GGT GTC TGT			1920
Phe Gln Gly Gln Thr Cys Glu Met Cys Gln Thr Cys Leu Gly Val Cys			
605	610	615	620
GCT GAG CAT AAA GAA TGT GTT CAG TGC AGA GCC TTC AAT AAA GGA GAA			1968

Ala Glu His Lys Glu Cys Val Gln Cys Arg Ala Phe Asn Lys Gly Glu	
625 630 635	
AAG AAA GAC ACA TGC ACA CAG GAA TGT TCC TAT TTT AAC ATT ACC AAG	2016
Lys Lys Asp Thr Cys Thr Gln Glu Cys Ser Tyr Phe Asn Ile Thr Lys	
640 645 650	
GTA GAA AGT CGG GAC AAA TTA CCC CAG CCG GTC CAA CCT GAT CCT GTG	2064
Val Glu Ser Arg Asp Lys Leu Pro Gln Pro Val Gln Pro Asp Pro Val	
655 660 665	
TCC CAT TGT AAG GAG AAG GAT GTT GAC GAC TGT TGG TTC TAT TTT ACG	2112
Ser His Cys Lys Glu Lys Asp Val Asp Asp Cys Trp Phe Tyr Phe Thr	
670 675 680	
TAT TCA GTG AAT GGG AAC AAC GAG GTC ATG GTT CAT GTT GTG GAG AAT	2160
Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn	
685 690 695 700	
CCA GAG TGT CCC ACT GGT CCA GAG GAT CCC GAG CTGCTGGAAG CAGGCTCAGC	2213
Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Glu Asp Pro Glu	
705 710	
GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC AGGGCAGCAA GGCAGGCCCC	2273
GTCTGCCTCT TCACCCGGAG CCTCTGCCCCG CCCCACTCAT GCTCAGGGAG AGGGTCTTCT	2333
GGCTTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCCCTGCACA	2393
CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC	2453
TGACCTAAGC CCACCCCAAA GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC	2513
CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC	2568
Glu Pro Lys Ser Cys Asp	
715	
AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG CCCAGGCCTC	2615
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	
720 725	
GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG GACAGGCCCC	2675

AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTCCTCA GCA CCT GAA CTC CTG 2728

Ala Pro Glu Leu Leu

730

GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC 2776

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

735

740

745

ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC 2824

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

750

755

760

CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG 2872

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

765

770

775

GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG 2920

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

780

785

790

795

TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT 2968

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

800

805

810

GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC 3016

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

815

820

825

ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG 3063

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

830

835

AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC 3123

CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG 3172

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

840

845

CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC 3220

Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		850					855					860				
CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	3268
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
		865				870						875				
AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAT	3316
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
880					885					890				895		
TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	3364
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
			900					905				910				
AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	3412
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
		915				920						925				
CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	3460
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		930				935						940				
TGA																3463

【0085】

配列番号：3

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

1

5

10

【0086】

配列番号：4

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCGGATCCCG AGCTGCTGGA AGCAGGCTCA G

31

【0087】

配列番号 : 5

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGACGG CCGTCGCAC TCATTTA

27

【0088】

配列番号 : 6

配列の長さ : 73

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTAGACCACC ATGTTCCCCA CCGAGAGCGC ATGGCTTGGG AAGCGAGGCG CGAACCCGGG

CCCCGGAGCT GCA

73

【0089】

配列番号 : 7

配列の長さ : 65

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTTCGGGGC CCGGGTTCGC GCCTCGCTTC CCAAGCCATG CGCTCTCGGT GGGGAACATG
GTGGT

65

【0090】

配列番号：8

配列の長さ：51

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCCGGGAGA CGGTGATGCT GTTGCTGTGC CTGGGGGTCC CGACCGGCAG G

51

【0091】

配列番号：9

配列の長さ：55

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTGCCGGTC GGGACCCCA GGCACAGCAA CAGCATCACC GTCTCCCGGA GTCGA

55

【0092】

配列番号：10

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACTGCAGGC AGGCCTTACA ACGTGGACAC TGAGAGC

37

【0093】

配列番号：11

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCAGAAACCT GTAAATCAGC AG

22

【0094】

配列番号：12

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCATTTATGC GGAAAGATGT GC

22

【0095】

配列番号：13

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGGGATCCGT GAAATAACGT TTGGGTCTT

29

【0096】

配列番号：14

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGGAAAAGA TGAATTTACA AC

22

【0097】

配列番号：15

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGGGATCCT CTGGACCACT GGGACAC

27

【0098】

配列番号：16

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

1 5 10

【0099】

配列番号：17

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Pro Glu Ile Leu Glu Val Pro Ser Thr

1 5 10

【0100】

配列番号：18

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1 5

【0101】

配列番号：19

配列の長さ：4675

配列の型：核酸

配列

ATG GGG CCA GAA CGG ACA GGG GCC GCG CCG CTG CCG CTG CTG CTG GTG 48

Met Gly Pro Glu Arg Thr Gly Ala Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Val

-25 -20 -15

TTA GCG CTC AGT CAA GGC ATT TTA AAT TGT TGT TTG GCC TAC AAT GTT 96

Leu Ala Leu Ser Gln Gly Ile Leu Asn Cys Cys Leu Ala Tyr Asn Val

-10	-5	1	
GGT CTC CCA GAA GCA AAA ATA TTT TCC GGT CCT TCA AGT GAA CAG TTT	114		
Gly Leu Pro Glu Ala Lys Ile Phe Ser Gly Pro Ser Ser Glu Gln Phe			
5 10 15			
GGG TAT GCA GTG CAG CAG TTT ATA AAT CCA AAA GGC AAC TGG TTA CTG	192		
Gly Tyr Ala Val Gln Gln Phe Ile Asn Pro Lys Gly Asn Trp Leu Leu			
20 25 30 35			
GTT GGT TCA CCC TGG AGT GGC TTT CCT GAG AAC CGA ATG GGA GAT GTG	240		
Val Gly Ser Pro Trp Ser Gly Phe Pro Glu Asn Arg Met Gly Asp Val			
40 45 50			
TAT AAA TGT CCT GTT GAC CTA TCC ACT GCC ACA TGT GAA AAA CTA AAT	288		
Tyr Lys Cys Pro Val Asp Leu Ser Thr Ala Thr Cys Glu Lys Leu Asn			
55 60 65			
TTG CAA ACT TCA ACA AGC ATT CCA AAT GTT ACT GAG ATG AAA ACC AAC	336		
Leu Gln Thr Ser Thr Ser Ile Pro Asn Val Thr Glu Met Lys Thr Asn			
70 75 80			
ATG AGC CTC GGC TTG ATC CTC ACC AGG AAC ATG GGA ACT GGA GGT TTT	384		
Met Ser Leu Gly Leu Ile Leu Thr Arg Asn Met Gly Thr Gly Gly Phe			
85 90 95			
CTC ACA TGT GGT CCT CTG TGG GCA CAG CAA TGT GGG AAT CAG TAT TAC	432		
Leu Thr Cys Gly Pro Leu Trp Ala Gln Gln Cys Gly Asn Gln Tyr Tyr			
100 105 110 115			
ACA ACG GGT GTG TGT TCT GAC ATC AGT CCT GAT TTT CAG CTC TCA GCC	480		
Thr Thr Gly Val Cys Ser Asp Ile Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala			
120 125 130			
AGC TTC TCA CCT GCA ACT CAG CCC TGC CCT TCC CTC ATA GAT GTT GTG	528		
Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val			
135 140 145			
GTT GTG TGT GAT GAA TCA AAT AGT ATT TAT CCT TGG GAT GCA GTA AAG	576		

Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys	
150 155 160	
AAT TTT TTG GAA AAA TTT GTA CAA GGC CTT GAT ATA GGC CCC ACA AAG	624
Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys	
165 170 175	
ACA CAG GTG GGG TTA ATT CAG TAT GCC AAT AAT CCA AGA GTT GTG TTT	672
Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe	
180 185 190 195	
AAC TTG AAC ACA TAT AAA ACC AAA GAA GAA ATG ATT GTA GCA ACA TCC	720
Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys Glu Glu Met Ile Val Ala Thr Ser	
200 205 210	
CAG ACA TCC CAA TAT GGT GGG GAC CTC ACA AAC ACA TTC GGA GCA ATT	768
Gln Thr Ser Gln Tyr Gly Gly Asp Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile	
215 220 225	
CAA TAT GCA AGA AAA TAT GCC TAT TCA GCA GCT TCT GGT GGG CGA CGA	816
Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg	
230 235 240	
AGT GCT ACG AAA GTA ATG GTA GTT GTA ACT GAC GGT GAA TCA CAT GAT	864
Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp	
245 250 255	
GGT TCA ATG TTG AAA GCT GTG ATT GAT CAA TGC AAC CAT GAC AAT ATA	912
Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile	
260 265 270 275	
CTG AGG TTT GGC ATA GCA GTT CTT GGG TAC TTA AAC AGA AAC GCC CTT	960
Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu	
280 285 290	
GAT ACT AAA AAT TTA ATA AAA GAA ATA AAA GCG ATC GCT AGT ATT CCA	1008
Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro	
295 300 305	

ACA GAA AGA TAC TTT TTC AAT GTG TCT GAT GAA GCA GCT CTA CTA GAA	1056
Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu	
310 315 320	
AAG GCT GGG ACA TTA GGA GAA CAA ATT TTC AGC ATT GAA GGT ACT GTT	1104
Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val	
325 330 335	
CAA GGA GGA GAC AAC TTT CAG ATG GAA ATG TCA CAA GTG GGA TTC AGT	1152
Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met Glu Met Ser Gln Val Gly Phe Ser	
340 345 350 355	
GCA GAT TAC TCT TCT CAA AAT GAT ATT CTG ATG CTG GGT GCA GTG GGA	1200
Ala Asp Tyr Ser Ser Gln Asn Asp Ile Leu Met Leu Gly Ala Val Gly	
360 365 370	
GCT TTT GGC TGG AGT GGG ACC ATT GTC CAG AAG ACA TCT CAT GGC CAT	1248
Ala Phe Gly Trp Ser Gly Thr Ile Val Gln Lys Thr Ser His Gly His	
375 380 385	
TTG ATC TTT CCT AAA CAA GCC TTT GAC CAA ATT CTG CAG GAC AGA AAT	1296
Leu Ile Phe Pro Lys Gln Ala Phe Asp Gln Ile Leu Gln Asp Arg Asn	
390 395 400	
CAC AGT TCA TAT TTA GGT TAC TCT GTG GCT GCA ATT TCT ACT GGA GAA	1344
His Ser Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Ala Ala Ile Ser Thr Gly Glu	
405 410 415	
AGC ACT CAC TTT GTT GCT GGT GCT CCT CGG GCA AAT TAT ACC GGC CAG	1392
Ser Thr His Phe Val Ala Gly Ala Pro Arg Ala Asn Tyr Thr Gly Gln	
420 425 430 435	
ATA GTG CTA TAT AGT GTG AAT GAG AAT GGC AAT ATC ACG GTT ATT CAG	1440
Ile Val Leu Tyr Ser Val Asn Glu Asn Gly Asn Ile Thr Val Ile Gln	
440 445 450	
GCT CAC CGA GGT GAC CAG ATT GGC TCC TAT TTT GGT AGT GTG CTG TGT	1488
Ala His Arg Gly Asp Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Ser Val Leu Cys	

455	460	465	
TCA GTT GAT GTG GAT AAA GAC ACC ATT ACA GAC GTG CTC TTG GTA GGT			1536
Ser Val Asp Val Asp Lys Asp Thr Ile Thr Asp Val Leu Leu Val Gly			
470	475	480	
GCA CCA ATG TAC ATG AGT GAC CTA AAG AAA GAG GAA GGA AGA GTC TAC			1584
Ala Pro Met Tyr Met Ser Asp Leu Lys Lys Glu Glu Gly Arg Val Tyr			
485	490	495	
CTG TTT ACT ATC AAA AAG GGC ATT TTG GGT CAG CAC CAA TTT CTT GAA			1632
Leu Phe Thr Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gly Gln His Gln Phe Leu Glu			
500	505	510	515
GGC CCC GAG GGC ATT GAA AAC ACT CGA TTT GGT TCA GCA ATT GCA GCT			1680
Gly Pro Glu Gly Ile Glu Asn Thr Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Ala			
520	525	530	
CTT TCA GAC ATC AAC ATG GAT GGC TTT AAT GAT GTG ATT GTT GGT TCA			1728
Leu Ser Asp Ile Asn Met Asp Gly Phe Asn Asp Val Ile Val Gly Ser			
535	540	545	
CCA CTA GAA AAT CAG AAT TCT GGA GCT GTA TAC ATT TAC AAT GGT CAT			1776
Pro Leu Glu Asn Gln Asn Ser Gly Ala Val Tyr Ile Tyr Asn Gly His			
550	555	560	
CAG GGC ACT ATC CGC ACA AAG TAT TCC CAG AAA ATC TTG GGA TCC GAT			1824
Gln Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Ile Leu Gly Ser Asp			
565	570	575	
GGA GCC TTT AGG AGC CAT CTC CAG TAC TTT GGG AGG TCC TTG GAT GGC			1872
Gly Ala Phe Arg Ser His Leu Gln Tyr Phe Gly Arg Ser Leu Asp Gly			
580	585	590	595
TAT GGA GAT TTA AAT GGG GAT TCC ATC ACC GAT GTG TCT ATT GGT GCC			1920
Tyr Gly Asp Leu Asn Gly Asp Ser Ile Thr Asp Val Ser Ile Gly Ala			
600	605	610	
TTT GGA CAA GTG GTT CAA CTC TGG TCA CAA AGT ATT GCT GAT GTA GCT			1968

Phe Gly Gln Val Val Gln Leu Trp Ser Gln Ser Ile Ala Asp Val Ala	
615 620 625	
ATA GAA GCT TCA TTC ACA CCA GAA AAA ATC ACT TTG GTC AAC AAG AAT	2016
Ile Glu Ala Ser Phe Thr Pro Glu Lys Ile Thr Leu Val Asn Lys Asn	
630 635 640	
GCT CAG ATA ATT CTC AAA CTC TGC TTC AGT GCA AAG TTC AGA CCT ACT	2064
Ala Gln Ile Ile Leu Lys Leu Cys Phe Ser Ala Lys Phe Arg Pro Thr	
645 650 655	
AAG CAA AAC AAT CAA GTG GCC ATT GTA TAT AAC ATC ACA CTT GAT GCA	2112
Lys Gln Asn Asn Gln Val Ala Ile Val Tyr Asn Ile Thr Leu Asp Ala	
660 665 670 675	
GAT GGA TTT TCA TCC AGA GTA ACC TCC AGG GGG TTA TTT AAA GAA AAC	2160
Asp Gly Phe Ser Ser Arg Val Thr Ser Arg Gly Leu Phe Lys Glu Asn	
680 685 690	
AAT GAA AGG TGC CTG CAG AAG AAT ATG GTA GTA AAT CAA GCA CAG AGT	2208
Asn Glu Arg Cys Leu Gln Lys Asn Met Val Val Asn Gln Ala Gln Ser	
695 700 705	
TGC CCC GAG CAC ATC ATT TAT ATA CAG GAG CCC TCT GAT GTT GTC AAC	2256
Cys Pro Glu His Ile Ile Tyr Ile Gln Glu Pro Ser Asp Val Val Asn	
710 715 720	
TCT TTG GAT TTG CGT GTG GAC ATC AGT CTG GAA AAC CCT GGC ACT AGC	2304
Ser Leu Asp Leu Arg Val Asp Ile Ser Leu Glu Asn Pro Gly Thr Ser	
725 730 735	
CCT GCC CTT GAA GCC TAT TCT GAG ACT GCC AAG GTC TTC AGT ATT CCT	2352
Pro Ala Leu Glu Ala Tyr Ser Glu Thr Ala Lys Val Phe Ser Ile Pro	
740 745 750 755	
TTC CAC AAA GAC TGT GGT GAG GAT GGA CTT TGC ATT TCT GAT CTA GTC	2400
Phe His Lys Asp Cys Gly Glu Asp Gly Leu Cys Ile Ser Asp Leu Val	
760 765 770	

CTA GAT GTC CGA CAA ATA CCA GCT GCT CAA GAA CAA CCC TTT ATT GTC	2448
Leu Asp Val Arg Gln Ile Pro Ala Ala Gln Glu Gln Pro Phe Ile Val	
775 780 785	
AGC AAC CAA AAC AAA AGG TTA ACA TTT TCA GTA ACA CTG AAA AAT AAA	2496
Ser Asn Gln Asn Lys Arg Leu Thr Phe Ser Val Thr Leu Lys Asn Lys	
790 795 800	
AGG GAA AGT GCA TAC AAC ACT GGA ATT GTT GTT GAT TTT TCA GAA AAC	2544
Arg Glu Ser Ala Tyr Asn Thr Gly Ile Val Val Asp Phe Ser Glu Asn	
805 810 815	
TTG TTT TTT GCA TCA TTC TCC CTA CCG GTT GAT GGG ACA GAA GTA ACA	2592
Leu Phe Phe Ala Ser Phe Ser Leu Pro Val Asp Gly Thr Glu Val Thr	
820 825 830 835	
TGC CAG GTG GCT GCA TCT CAG AAG TCT GTT GCC TGC GAT GTA GGC TAC	2640
Cys Gln Val Ala Ala Ser Gln Lys Ser Val Ala Cys Asp Val Gly Tyr	
840 845 850	
CCT GCT TTA AAG AGA GAA CAA CAG GTG ACT TTT ACT ATT AAC TTT GAC	2688
Pro Ala Leu Lys Arg Glu Gln Gln Val Thr Phe Thr Ile Asn Phe Asp	
855 860 865	
TTC AAT CTT CAA AAC CTT CAG AAT CAG GCG TCT CTC AGT TTC CAA GCC	2736
Phe Asn Leu Gln Asn Leu Gln Asn Gln Ala Ser Leu Ser Phe Gln Ala	
870 875 880	
TTA AGT GAA AGC CAA GAA GAA AAC AAG GCT GAT AAT TTG GTC AAC CTC	2784
Leu Ser Glu Ser Gln Glu Glu Asn Lys Ala Asp Asn Leu Val Asn Leu	
885 890 895	
AAA ATT CCT CTC CTG TAT GAT GCT GAA ATT CAC TTA ACA AGA TCT ACC	2832
Lys Ile Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Glu Ile His Leu Thr Arg Ser Thr	
900 905 910 915	
AAC ATA AAT TTT TAT GAA ATC TCT TCG GAT GGG AAT GTT CCT TCA ATC	2880
Asn Ile Asn Phe Tyr Glu Ile Ser Ser Asp Gly Asn Val Pro Ser Ile	

920	925	930	
GTG CAC AGT TTT GAA GAT GTT GGT CCA AAA TTC ATC TTC TCC CTG AAG			2929
Val His Ser Phe Glu Asp Val Gly Pro Lys Phe Ile Phe Ser Leu Lys			
935	940	945	
GTA ACA ACA GGA AGT GTT CCA GTA AGC ATG GCA ACT GTA ATC ATC CAC			2976
Val Thr Thr Gly Ser Val Pro Val Ser Met Ala Thr Val Ile Ile His			
950	955	960	
ATC CCT CAG TAT ACC AAA GAA AAG AAC CCA CTG ATG TAC CTA ACT GGG			3024
Ile Pro Gln Tyr Thr Lys Glu Lys Asn Pro Leu Met Tyr Leu Thr Gly			
965	970	975	
GTG CAA ACA GAC AAG GCT GGT GAC ATC AGT TGT AAT GCA GAT ATC AAT			3072
Val Gln Thr Asp Lys Ala Gly Asp Ile Ser Cys Asn Ala Asp Ile Asn			
980	985	990	995
CCA CTG AAA ATA GGA CAA ACA TCT TCT TCT GTA TCT TTC AAA AGT GAA			3120
Pro Leu Lys Ile Gly Gln Thr Ser Ser Ser Val Ser Phe Lys Ser Glu			
1000	1005	1010	
AAT TTC AGG CAC ACC AAA GAA TTG AAC TGC AGA ACT GCT TCC TGT AGT			3168
Asn Phe Arg His Thr Lys Glu Leu Asn Cys Arg Thr Ala Ser Cys Ser			
1015	1020	1025	
AAT GTT ACC TGC TGG TTG AAA GAC GTT CAC ATG AAA GGA GAA TAC TTT			3216
Asn Val Thr Cys Trp Leu Lys Asp Val His Met Lys Gly Glu Tyr Phe			
1030	1035	1040	
GTT AAT GTG ACT ACC AGA ATT TGG AAC GGG ACT TTC GCA TCA TCA ACG			3264
Val Asn Val Thr Thr Arg Ile Trp Asn Gly Thr Phe Ala Ser Ser Thr			
1045	1050	1055	
TTC CAG ACA GTA CAG CTA ACG GCA GCT GCA GAA ATC AAC ACC TAT AAC			3312
Phe Gln Thr Val Gln Leu Thr Ala Ala Ala Glu Ile Asn Thr Tyr Asn			
1060	1065	1070	1075
CCT GAG ATA TAT GTG ATT GAA GAT AAC ACT GTT ACG ATT CCC CTG ATG			3360

Pro Glu Ile Tyr Val Ile Glu Asp Asn Thr Val Thr Ile Pro Leu Met										
1080			1085			1090				
ATA ATG AAA CCT GAT GAG AAA GCC GAA GTA CCA ACA GAT CCC GAG									3405	
Ile Met Lys Pro Asp Glu Lys Ala Glu Val Pro Thr Asp Pro Glu										
1095			1100			1105				
CTGCTGGAAG CAGGCTCAGC GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC									3465	
AGGGCAGCAA GGCAGGCCCC GTCTGCCTCT TCACCCGGAG CCTCTGCCCG CCCCACTCAT									3525	
GCTCAGGGAG AGGGTCTTCT GGCTTTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC									3585	
CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC CAAGAGCCAT									3645	
ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAAA GGCCAAACTC TCCACTCCCT									3705	
CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCA									3762	
GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA									3807	
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro										
1110			1115			1120				
GGTAAGCCAG CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC									3867	
TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA									3925	
GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA									3973	
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys										
1125			1130			1135				
CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG									4021	
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val										
1140			1145			1150				
GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC									4069	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr										
1155			1160			1165				
GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG									4117	
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu										
1170			1175			1180			1185	
CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC									4165	

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
1190 1195 1200	
CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA	4213
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
1205 1210 1215	
GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA	4255
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	
1220 1225 1230	
GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC	4315
CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA	4369
Gly Gln Pro Arg Glu Pro	
1235	
CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG	4417
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln	
1240 1245 1250	
GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC	4465
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	
1255 1260 1265	
GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG	4513
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	
1270 1275 1280 1285	
CCT CCC GTG CTG GAT TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC	4561
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	
1290 1295 1300	
ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC	4609
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	
1305 1310 1315	
GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC	4657
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	

1320

1325

1330

CTG TCT CCG GGT AAA TGA

4675

Leu Ser Pro Gly Lys

1335

【0102】

配列番号：20

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTCGAGCAA ACCCAGCGCA ACTACGG

27

【0103】

配列番号：21

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATAGTGCCCT GATGACCATT G

21

【0104】

配列番号：22

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATGGCTTTA ATGATGTGAT TG

22

【0105】

配列番号：23

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGTTGGTACT TCGGCTTTCT C

21

【図面の簡単な説明】

【図1】 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる精製蛋白質が、SDS-PAGEにより、非還元下で2本、還元下で4本の泳動パターンをとることを示す。

【図2】 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる蛋白質が、抗インテグリン $\alpha 4$ 抗体、抗インテグリン $\beta 1$ 抗体結合ビーズのどちらを用いても同一パターンで沈降することを示す。また、陽イオンキレート剤であるEDTAの存在下でも同一の沈降パターンを示す。

【図3】 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、SDS存在下での煮沸により解離しないことを示す。

【図4】 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がVCAM-1発現細胞に結合すること、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるEDTAにより阻害されることを示す。

【図5】 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がCS-1ペプチドに結合し、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるEDTAにより阻害されることを示す。

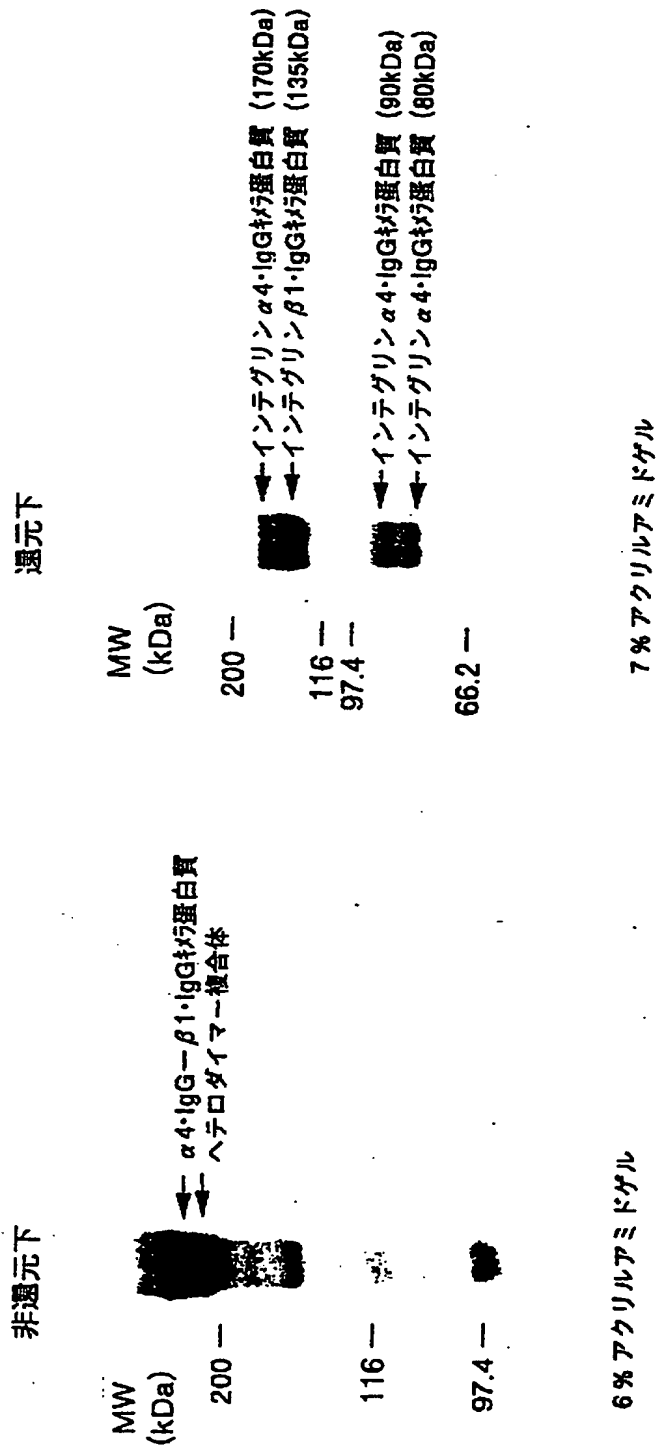
【図6】 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とCS-1-IgGとの結合が、GPEILDVPSTにより阻害され、他のペプチドでは阻害されないことを示す。

【図7】 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる精製蛋白質が、SDS-PAGEにより、非還元下で1本、還元下で2本の泳動パターンをとることを示す。

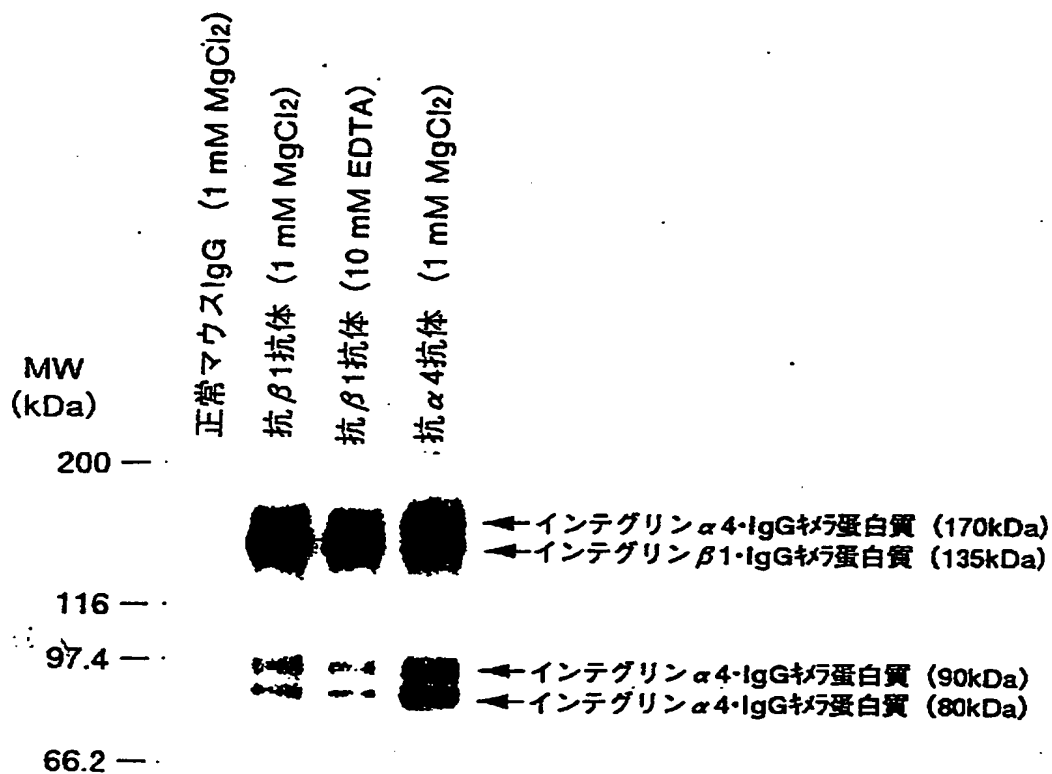
【図8】 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がコラーゲンに結合し、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるEDTAにより阻害されることを示す。

【書類名】 図面

【図1】

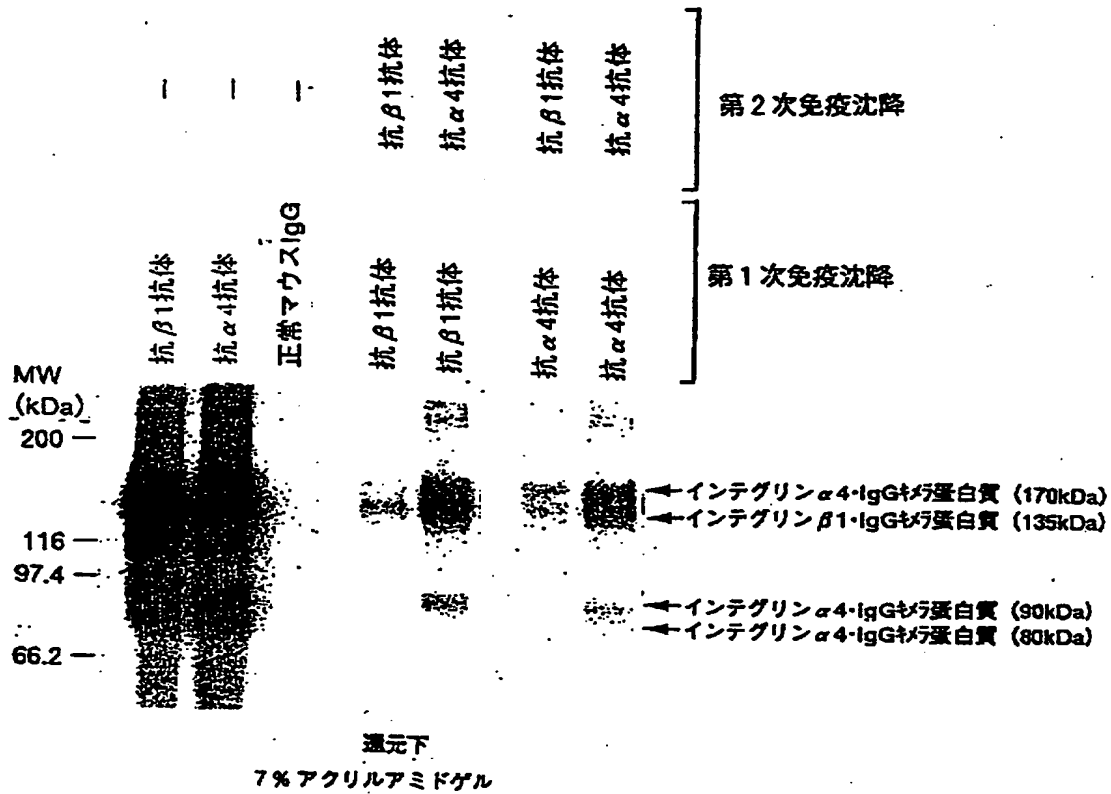


【図2】

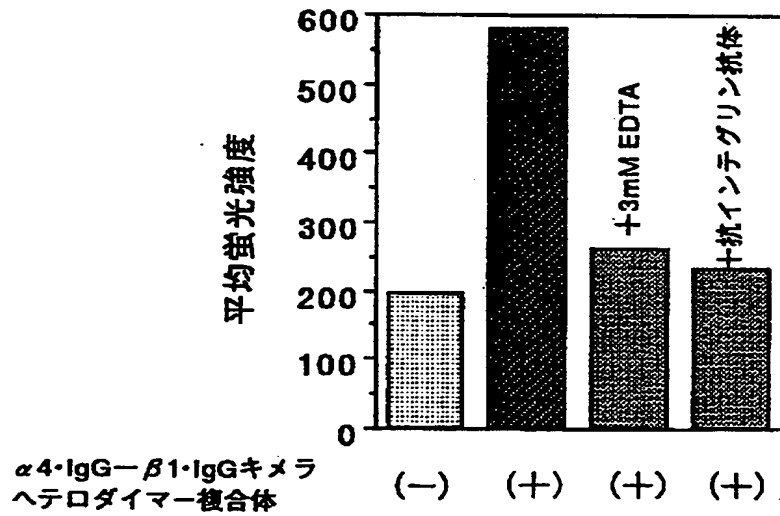


還元下
7% アクリルアミドゲル

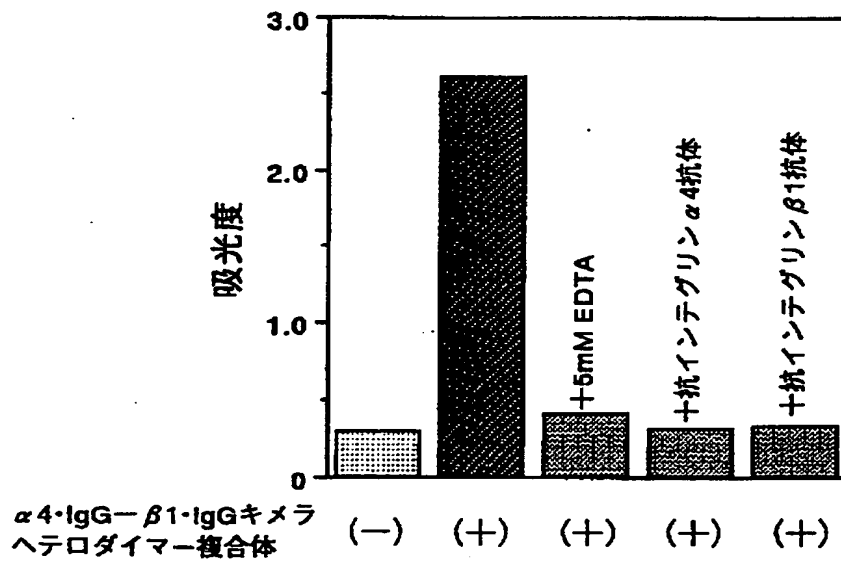
【図3】



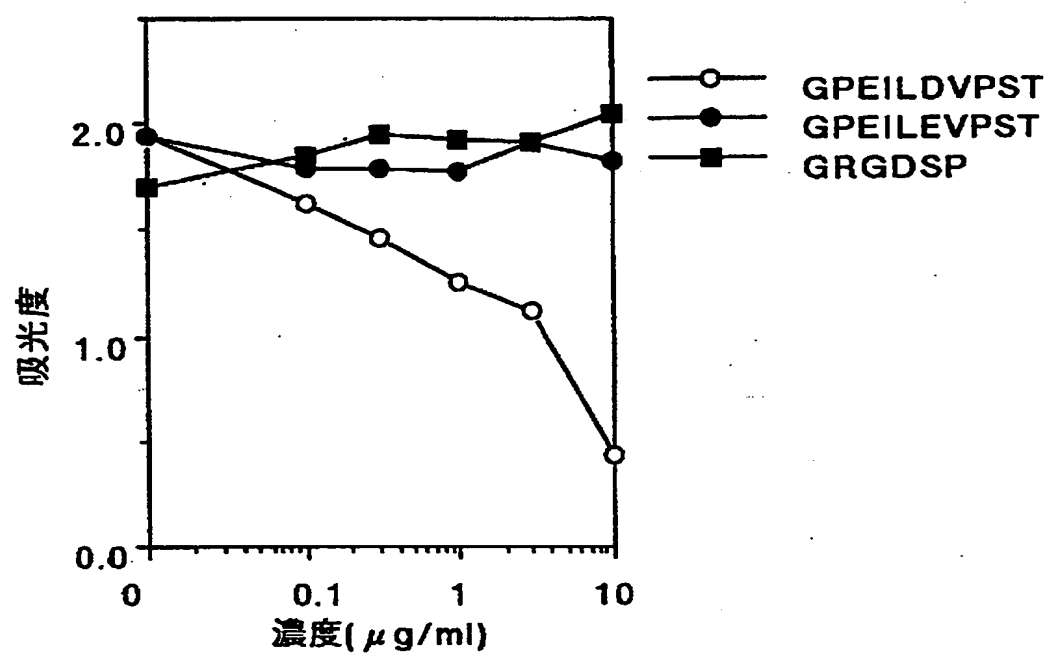
【図4】



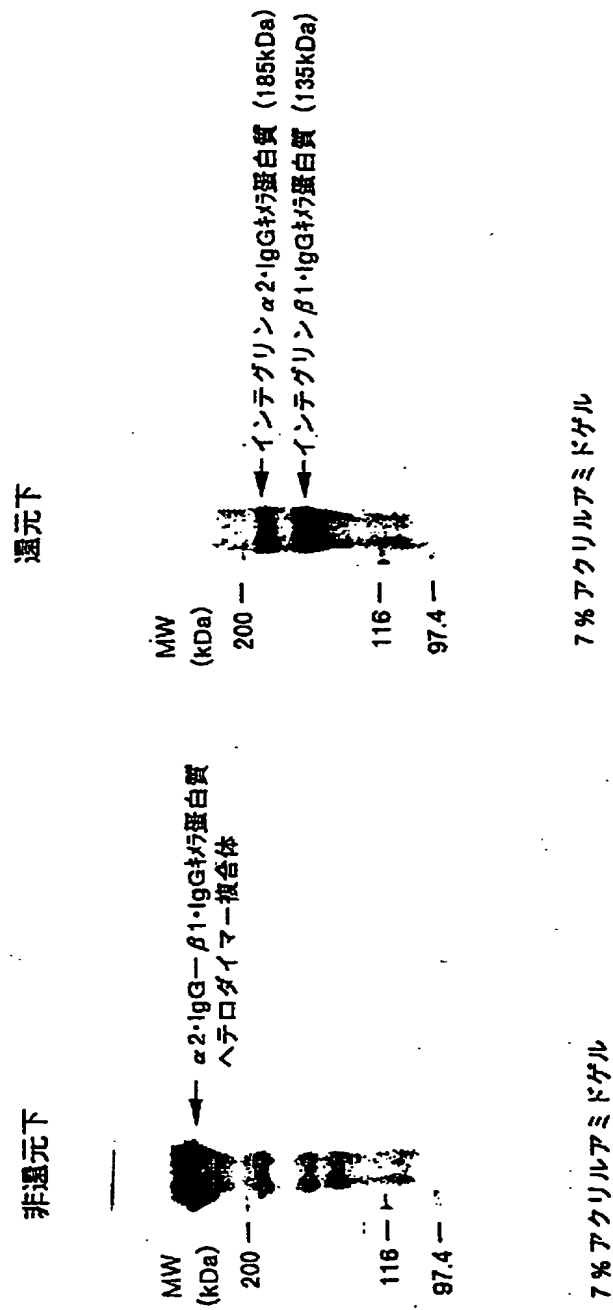
【図5】



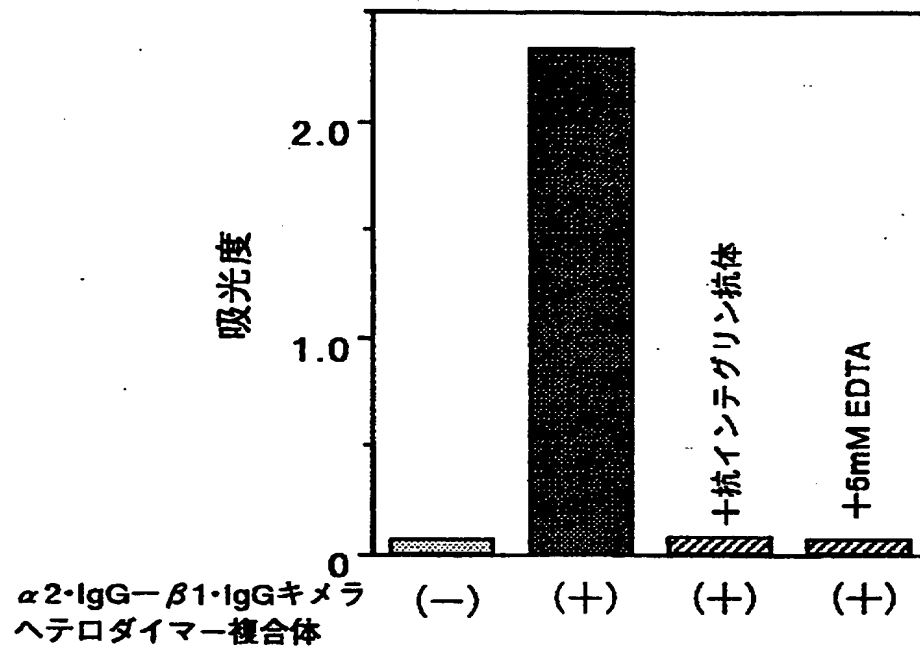
【図6】



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 インテグリンの $\alpha 4$ 、 $\beta 1$ および $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ をそれぞれIgG重鎖とキメラ化して $\alpha \beta$ ヘテロダイマーを構造的に安定に会合させたことを特徴とするインテグリン $\alpha 4 \cdot \text{IgG重鎖}-\beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体およびインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG重鎖}-\beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体、その製造方法、これを用いるインテグリン $\alpha 4 \beta 1$ およびインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ トリガンドとの結合の測定方法、阻害物質の探索方法、医薬品としての利用、診断薬・試薬としての利用。

【効果】 本発明により、インテグリンの $\alpha 4$ 、 $\beta 1$ および $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ をそれぞれIgG重鎖とキメラ化して $\alpha \beta$ ヘテロダイマーを構造的に安定に会合させたことを特徴とするインテグリン $\alpha 4 \cdot \text{IgG重鎖}-\beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体およびインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG重鎖}-\beta 1 \cdot \text{IgG重鎖}$ キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を調製することが可能となり、その医薬用途、診断薬および試薬用途、これらのヘテロダイマー複合体を用いるリガンドとの結合の測定方法、阻害物質の探索方法、新規リガンドの探索方法が見出された。

【選択図】 なし

特平 9-015118

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000003159

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

【氏名又は名称】

東レ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003159]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
氏 名	東レ株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)